DER VORLÄUFER DES OmpA PROTEINS, EINES DER HAUPTPROTEINE AUS DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KONRAD GAMON

aus Frankfurt/Main

1981

DER VORLÄUFER DES OmpA PROTEINS, EINES DER HAUPTPROTEINE AUS DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KONRAD GAMON

aus Frankfurt/Main

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.81
Dekan: Prof. Dr. A. Hager
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Henning
2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Im Andenken
an meinen Großvater
Dr. Ing. August Sieper

Diese Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Henning am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. U. Henning für die Überlassung des Themas, für förderndes Interesse und wertvolle Ratschläge;

Frau W. Schmidmayr für die Durchführung des Edman-Abbaus;

Frau I. Haar für die Isolierung von Plasmid-DNA;

Herrn Dr. U. Mallik vom Kernforschungszentrum Karlsruhe für die tatkräftige Unterstützung bei der in vitro Proteinsynthese;

Frau I. Becker für die Bereitstellung von Test-Phagen;

Herrn Dr. I. Crowlesmith, Herrn E. Bremer und Herrn Dr. S. Cole für inspirierende Diskussionen in Labor und Mensa;

der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung;

und generell allen Mitarbeitern der Abteilung für gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548922_0018

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	11
II.1	Stämme und Plasmide	11
II.2	Medien und Puffer	12
II.3	Chemikalien	14
II.4	Allgemeine Methoden	15
II.4.1	Messung der Zelldichte	15
II.4.2	Präparation von Zellhüllen	15
II.4.3	Immunfällung	15
II.4.4	Präparation der Staphylococcus-Zellen für die Immunfällung	16
II.4.5	SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese	16
II.4.6	Autoradiographie und Fluorographie	17
II.4.7	Szintillationszählung von radioaktiven Gelstückchen	17
II.4.8	Präparation der Minizellen	17
II.4.8.1	Anfertigen der Sucrosegradienten	17
II.4.8.2	Isolierung der Minizellen	18
II.4.8.3	Markierung der Minizellen mit ^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein	18
II.4.8.4	Präparation von Zellhüllen aus Minizellen	19
II.4.9	Konstruktion von Plasmidmutanten des OmpA Gens	19
II.5	Charakterisierung des pro-OmpA Proteins in Minizellen	19
II.5.1	Partielle Proteolyse mit Staphylococcus V8-Protease und Chymotrypsin	19
II.5.2	Lösen der Proben für die SDS-PAGE	20
II.6	Versuche zur Anreicherung in vivo des pro-OmpA Proteins	20

		Seite
II.6.1	Radioaktive Markierung von Minizellen in Anwesenheit von Procain, TLCK und PAB	20
II.6.2	Test auf Phagenempfindlichkeit in Anwesenheit von Procain	21
II.6.3	Sphäroplastenbildung	21
II.6.4	Triton X-100 Extraktion bei Minizellen	21
II.6.5	Sarkosyl-Extraktion bei Minizellen	22
II.7	Isolierung des pro-OmpA Proteins aus Minizellen	22
II.7.1	Säulenchromatographische Methoden	22
II.7.1.1	Trennung mit Sephacryl S-200 Superfine	22
II.7.1.2	Trennung mit Ultrogel AcA 54	22
II.7.2	Proteinelution aus einem SDS-Polyacrylamidgel	23
II.7.2.1	Radioaktive Markierung der Minizellen	23
II.7.2.2	Extraktion des Coomassie-Blau aus dem SDS-Polyacrylamidgel	24
II.7.2.3	Elektro-Elution	24
II.7.2.4	Sequenzierung nach Edman	25
II.8	Charakterisierung von UH 100/pTU 100 und seiner Plasmidmutante pTU 105	26
II.8.1	Osmotischer Schock	26
II.8.2	Sarkosyl-Extraktion normaler Zellen	26
II.8.3	Trennung von innerer und äußerer Membran	27
II.8.4	Trypsinverdauung von ganzen Zellen	28
II.8.5	Pronaseverdauung von ganzen Zellen	28
II.9	Untersuchungen der Synthese des pro-OmpA Proteins bei 25°C	28
II.9.1	Puls-Versuch mit ^{35}S-Methionin	28
II.9.2	"Pulse-chase" Versuch mit ^{35}S-Methionin	29
II.9.3	Zellhüllenpräparation mit Hilfe von Ultraschall oder der Frenchpress	29
II.9.4	Isolierung von innerer und äußerer Membran aus dem Frenchpress-Lysat	29

		Seite
II.10	DNA-abhängige in vitro Proteinsynthese	30
II.10.1	Präparation eines zellfreien Translations-Transkriptions-Systems aus E. coli	30
II.10.2	In vitro Proteinsynthese mit dem zellfreien System	31
III.	ERGEBNISSE	33
III.1	Charakterisierung des pro-OmpA Proteins in Minizellen	33
III.1.1	Immunfällung	33
III.1.2	Partielle Proteolyse	35
III.1.3	Hitzemodifizierbarkeit	37
III.2	Versuche zur Anreicherung in vivo von pro-OmpA Protein	38
III.2.1	Markierung in Anwesenheit von Proteolyse-Inhibitoren	38
III.2.2	Test auf Phagenempfindlichkeit in Anwesenheit von Procain	40
III.2.3	Zellhüllen nach Procain-Behandlung	41
III.2.4	Sphäroplastenpräparation	41
III.2.5	Detergens-Extraktion von Zellhüllen aus Minizellen	41
III.3	Isolierung des pro-OmpA Proteins	42
III.3.1	Säulenchromatographische Methoden	42
III.3.2	Proteinelution aus dem SDS-Polyacrylamidgel und Teilsequenzierung des pro-OmpA Proteins	45
III.4	Charakterisierung der Plasmidmutante pTU 105	48
III.4.1	Osmotischer Schock	49
III.4.2	Sarkosyl-Extraktion	49
III.4.3	Trennung von innerer und äußerer Membran	52
III.4.4	Trypsin- und Pronaseverdauung ganzer Zellen	53
III.5	Zwischenbilanz	55

		Seite
III.6	Das pro-OmpA Protein in P 400-6	57
III.6.1	Puls-Versuch bei 37°C bzw. 25°C	57
III.6.2	"Pulse-chase" Versuch bei 25°C	59
III.6.3	Lokalisierung des pro-OmpA Proteins	61
III.6.4	Der Vorläufer aus P 400-6 bei verschiedenen Lösungstemperaturen	63
III.7	OmpA-kodierte in vitro Proteinsynthese	66
III.7.1	In vitro Synthese mit verschiedenen Plasmiden	66
III.7.2	Versuche zur Signalabspaltung in vitro I: Effekt von Membranen	68
III.7.3	Versuche zur Signalabspaltung in vitro II: Effekt von Membranen in Kombination mit Triton X-100	69
III.7.4	Trypsinempfindlichkeit des in vitro Vorläufers	71
III.8	Die Satellitenproteine des OmpA Gens	75
IV.	DISKUSSION	78
V.	ZUSAMMENFASSUNG	94
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	95

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATP	Adenosintriphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylendiacrylamid
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
IE	Internationale Einheiten
konz.	konzentriert
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
Min.	Minute
OD_x	Optische Dichte bei x nm
PAB	p-Aminobenzamidin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PITC	Phenylisothiocyanat
psi	pounds per square inch
PTH	Phenylthiohydantoin
Ref.	Referenz
rpm	revolutions per minute
Sarkosyl	Natriumlaurylsarkosinat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TLCK	Tosyl-lysyl-chloromethylketon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UTP	Uridintriphosphat
v/v	volume/volume (Volumenprozent)
w/v	weight/volume (Gewichtsprozent)

Folgende Ausdrücke wurden aus dem Englischen übernommen, da eine sinnvolle Übersetzung nicht möglich ist:
"pulse-chase", "chase", (Ribosomen) wash

I. E I N L E I T U N G

Alle Mikroorganismen haben ein gemeinsames Problem: sie müssen sich nach außen hin schützen gegen eine Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Umwelteinflüssen und gleichzeitig einen Stoffaustausch zwischen Cytoplasma und Außenwelt gewährleisten. Den Bakterien ist eine solche Abgrenzung auf zweierlei Weise gelungen, die der Unterscheidung in Gram-positive und Gram-negative Organismen zugrunde liegt. In beiden Fällen wird die empfindliche Cytoplasmamembran, Sitz vieler Stoffwechselenzyme für die Energiegewinnung, den aktiven Transport und die Synthese von bestimmten Membranbestandteilen, durch zusätzlich aufgelagerte Strukturen geschützt.

Gram-positive Bakterien haben eine dicke, mehrschichtige Lage (15-30nm) aus Murein entwickelt, einem Makromolekül aus Zuckerketten mit Peptidquervernetzungen (46,129), an das Teichonsäuren kovalent gebunden sein können (8). Das Murein, auch Peptidoglycan oder Mucopeptid genannt, umschließt als sog. Sacculus die Zelle und schützt sie so gegen den hohen osmotischen Druck im Zellinneren, den die Cytoplasmamembran nicht abfangen könnte. Außerdem verleiht sie dem Bakterium vermutlich seine für die jeweilige Art charakteristische Gestalt (51).

Etwas anders sieht die Situation bei Gram-negativen Bakterien aus. Der Mureinsacculus ist hier sehr viel dünner (1-2nm), aber dafür ist ihm zusätzlich eine äußere Membran aufgelagert. Nach außen hin kann das Bakterium noch mit einer Schleimkapsel aus Polysacchariden abgegrenzt sein. Allgemein kann man die Zellhülle der Gram-negativen Bakterien in drei Kompartimente von unterschiedlicher Struktur und Funktion unterteilen. Innen befindet sich die Cytoplasmamembran mit den bereits erwähnten Funktionen, bestehend aus Phospholipiden und Proteinen. Es schließt sich der periplasmatische Raum an mit seinen hydrolytischen Enzymen und Bindeproteinen für den aktiven Transport bestimmter Substanzen (57,95), gefolgt von der dünnen

Mureinschicht, die über kovalent gebundenes Lipoprotein (19,21) die äußere Membran an sich verankert.
Diese äußere Membran ist der Cytoplasmamembran morphologisch ähnlich (93,98), unterscheidet sich aber wesentlich in der Zusammensetzung. Am auffälligsten ist das nur hier vorkommende Lipopolysaccharid (84,90,93) und die Tatsache, daß einige wenige Proteine in extrem hohen Konzentrationen vorkommen (21,53,60,105,107). Das Lipopolysaccharid, ein charakteristischer Bestandteil der äußeren Membran, kommt nur in ihrer äußeren Hälfte vor (84,93,119) und steht dort mit einigen Proteinen in spezifischer Wechselwirkung (7,32, 114,134). Die Analyse der Zusammensetzung der äußeren Membran zeigt, daß sie zu etwa 50% aus Protein besteht, während Lipopolysaccharid und Phospholipide etwa 30% bzw. 20% stellen (21,53,60,85,107,119).
Das Vorkommen einer charakteristischen äußeren Membran verleiht Gram-negativen Bakterien neben einer verstärkten mechanischen Stabilität besondere Eigenschaften. Als eine zusätzliche Permeationsbarriere (34,88) verhindert oder erschwert sie einerseits die Aufnahme von lipophilen Substanzen durch die hydrophilen Zuckerketten des Lipopolysaccharids (91). Andererseits wird der Austritt von löslichen Proteinen aus dem periplasmatischen Raum verhindert, bzw. erst die Existenz eines solchen Raumes ermöglicht. Die Proteine des periplasmatischen Raumes sind vorwiegend hydrolytische Enzyme, wie Nukleasen, Proteasen und Phosphatasen, deren Existenz im Inneren der Zelle diese schädigen würde, die aber der Zelle helfen, exogene Nährstoffe zu verwerten. Ferner befinden sich die Bindeproteine für den aktiven Transport niedermolekularer Nährstoffe, wie Zucker oder Aminosäuren im periplasmatischen Raum. Ebenfalls die äußere Membran ist es, die die Rezeptoren für Phagen und Colicine enthält (20,32,52) und der Zelle durch ihr Lipopolysaccharid besondere antigene Eigenschaften verleiht (neben der Schleimkapsel trägt das Lipopolysaccharid ebenfalls häufig zur Pathogenität des betreffenden Bakteriums bei).

Obwohl die äußere Membran eine zusätzliche schützende Permeationsbarriere darstellt, muß sie dennoch den Durchtritt lebensnotwendiger Nährstoffe gewährleisten. Diese Aufgabe wird durch die Proteine übernommen. Das Matrixprotein (107), mit etwa 100 000 Kopien/Zelle eines der Hauptproteine aus der äußeren Membran von Escherichia coli (s.Tab.1), bildet wassergefüllte Kanäle, die den unspezifischen Durchtritt von hydrophilen Substanzen, wie Zucker, Aminosäuren und anorganischen Ionen mit einem Ausschlußgewicht von 600-700 dalton ermöglichen (35,87,92). Dieses Protein wird deshalb auch Porin genannt (87), und kann bei Escherichia coli K-12 in mehreren Subspezies vorkommen (s.Tab.1 und Ref.94). Daneben existieren noch andere porenbildende Proteine mit einiger Spezifität, wie z.B..für Maltose und Maltodextrine (lamB Protein, Ref.103, 126,127) oder für Nukleoside (tsx-Protein, Ref.49). Substanzen, deren Molekulargewicht über der Ausschlußgrenze des Porins liegt, besitzen eigene, hochaffine Aufnahmesysteme (20).

Neben dem Matrixprotein kommen noch zwei weitere Hauptproteine in der äußeren Membran vor (s.Tab.1). Das Lipoprotein ist mit 5-8 x 10^5 Kopien/Zelle (106) das weitaus häufigste Protein in Escherichia coli. Zwei Drittel kommen in der äußeren Membran als freie Form vor (60), während ein Drittel kovalent mit dem Murein verknüpft ist (21). Das OmpA Protein, Gegenstand dieser Arbeit, erfüllt als Transmembranprotein (40) in der Zelle mehrere Aufgaben. Neben seiner unphysiologischen Funktion als Phagenrezeptor (5,32) ist es an der Konjugation auf Seite der Empfängerzelle beteiligt (5,113,117) und wird für die Wirkung des Colicins L benötigt (25). In Kombination mit dem Lipoprotein sorgt es für die Integrität der äußeren Membran und die Form der Zelle (122). Die Primärstruktur des OmpA Proteins ist kürzlich aufgeklärt und diese Sequenz bezüglich ihres Arrangements in der Membran ausführlich diskutiert worden (28). Auf dem Chromosom von Escherichia coli (9) konnte das Strukturgen bei ca. 21.5 Min. lokalisiert werden (33, 78).

Einheitliche Protein Nomenklatur	Frühere Bezeichnungen der Proteine[a]								Molekulargewicht	Genlocus (bei Min.)	Bezeichnung des Gens[b]
	B	F	H	I	L	M	S	R			
OmpA	B	TolG	II*	7	d	O-11	3a		35 000	21.5	ompA (tolG, con, tut)
OmpC	A_2		Ib	4	c	O-8	1b			47	ompC (par, meoA)
OmpF	A_1	TolF	Ia	4	b	O-9	1a	Matrix-protein	37 000	21	ompF (tolF, colB, coa, cry)
NmpA/B[c]		E	Ic		e		NmpA/B			82.2 8.6	nmpA[c] nmpB
Lipoprotein	F		IV	11		O-18			7 000	36.5	lpp (mlpA, lpm, lpo)
			III[d]						18 000		

Tab.1 Die Hauptproteine aus der äußeren Membran von Escherichia coli (für eine detaillierte Besprechung der Nomenklaturen s. Ref.94). [a]B=BRAGG (18), F=FOULDS (42), H=HENNING (53,55), I=INOUYE (106), L=LUGTENBERG (75), M=MIZUSHIMA (134), S=SCHNAITMAN (99,112), R=ROSENBUSCH (107). [b]Ursprüngliche Genbezeichnungen in Klammern. [c]Strukturgen noch nicht bestimmt, deshalb Benennung des Proteins noch unklar. Kommt nur in Mutanten vor, denen OmpF- und OmpC Protein fehlen (99). [d]Genaue Daten zur Funktion und Genetik dieses Proteins fehlen.

Allen Proteinen der äußeren Membran und auch den periplasmatischen Proteinen gemeinsam ist es, daß sie im Cytoplasma gebildet werden müssen, da nur dort die Proteinsynthese abläuft. Folglich müssen sie in irgendeiner Weise durch die Cytoplasmamembran hindurch an ihren Zielort gelangen. Hierbei stellt sich eine ganze Reihe von interessanten Fragen: wie kann die Zelle unterscheiden zwischen cytoplasmatischen Proteinen und solchen, die durch die innere Membran transportiert werden müssen, um an ihren spezifischen Zielort, das Periplasma oder die äußere Membran zu gelangen? Welche Mechanismen führen dazu, daß gewisse Proteine in den periplasmatischen Raum gebracht werden (oder auch in der inneren Membran bleiben), während andere Proteine in die äußere Membran eingebaut werden? Wie ist es überhaupt möglich, daß die löslichen Proteine des Periplasmas durch die hydrophobe Schicht der inneren Membran transportiert werden, wogegen andere Proteine, die in hydrophober Wechselwirkung mit der äußeren Membran stehen, in irgendeiner Weise durch den periplasmatischen Raum gelangen müssen?
Diese nur exemplarisch angeschnittenen Fragen zeigen, daß es sich hier um durchaus komplexe Mechanismen handeln muß. An ihrer Aufklärung arbeitete in den letzten Jahren eine größere Zahl verschiedener Arbeitsgruppen. Obwohl man von einem genauen Verständnis der Translokation und Einlagerung von Proteinen in die äußere Membran noch weit entfernt ist, haben sich bereits einige konkrete Vorstellungen herauskristallisiert. Einen ersten Anhaltspunkt lieferte die von MILSTEIN (8) vorgeschlagene und von BLOBEL & DOBBERSTEIN (16,17) weiterentwickelte Signalhypothese für die sekretorischen Proteine von Eukaryonten. Diese Proteine werden als Vorläufer mit einer zusätzlichen Sequenz von 15-30 Aminosäuren, der sog. Signalsequenz synthetisiert (Zusammenstellung in Ref.59). Man nimmt allgemein an, daß sie dazu dient, während der Synthese das betreffende Protein durch die Membran zu "dirigieren", wobei sie entweder während oder nach der Translokation von einer Signalpeptidase abgespalten wird, um das reife Protein

zu liefern. Ein analoger Vorgang wurde angesichts einer Vielzahl von Befunden für Prokaryonten postuliert. So werden alle bisher untersuchten Proteine der Gram-negativen Bakterien, die die innere Membran überqueren müssen, als Vorläufer mit einer charakteristischen Signalsequenz synthetisiert (eine Ausnahme scheinen die an der Konjugation beteiligten tra-Proteine [1,2] zu bilden). Die Primärstruktur der Signalsequenz ist für eine Reihe von sezernierten Proteinen ermittelt worden, und zwar für Proteine aus der äußeren Membran, wie das Lipoprotein (61), das lamB Protein (50) und das OmpA Protein (14,83) oder für die ß-Lactamase (125), ein periplasmatisches Enzym und die Bindeproteine für Maltose (15), Arabinose (132) und Leucin (96). Auch für die äußeren Membranproteine a (44) und das Matrixprotein (47,115) konnte die Existenz eines Vorläufers mit einer zusätzlichen Signalsequenz nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Proteinen mit ihren freien Ribosomen werden die sezernierten Proteine an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert (23,100,121,128). Was im Detail während der Synthese von sekretorischen Proteinen passiert, ist zur Zeit noch Gegenstand einer lebhaften Diskussion. Verschiedene Hypothesen sind formuliert worden, die jede für sich eine ganze Reihe der beobachteten Befunde erklären kann.

Die "Signalhypothese" von BLOBEL & DOBBERSTEIN (16,17) für die sekretorischen Proteine von Eukaryonten kann auch auf Prokaryonten angewandt werden und postuliert folgende Schritte: (1) Die Proteinsynthese beginnt an freien Ribosomen im Cytoplasma. (2) Das im Laufe der Synthese aus dem Ribosom herauskommende NH_2-terminale Ende, die Signalsequenz, bindet aufgrund seiner Hydrophobizität und/oder eines Rezeptorproteins an die innere Membran. (3) Proteine der Membran bilden eine Pore um das Signalpeptid; an diese Proteine bindet das Ribosom nicht-kovalent. (4) Im Laufe der Proteinsynthese (co-translationell) wird das Protein linear durch die Membranpore geschoben. (5) Eine Protease auf der anderen Seite der Membran spaltet die Signalsequenz ab. Es sollte aber bedacht werden, daß bis

jetzt die Existenz einer spezifischen Proteinpore weder sicher bestätigt noch widerlegt werden konnte.
Ein Vergleich der bis dahin in ihrer Primärstruktur bekannten Signalpeptide führte INOUYE zur Formulierung seines "loop-Modells" (59,106). Alle bis jetzt in ihrer Primärstruktur aufgeklärten Signalsequenzen (14,15,50,61, 83,96,125,132,s. auch Tab.7) weisen am NH_2-Terminus eine hydrophile Region von nicht mehr als acht Aminosäuren auf, die durch die Anwesenheit von mindestens zwei Lysin-, Histidin- oder Argininresten stark basisch ist. Es schließt sich eine vorwiegend hydrophobe Region von 15-19 Aminosäuren an, die bis zum Ende der Vorläufersequenz, der Spaltstelle reicht. Die Aminosäure an der Spaltstelle besitzt am αC-Atom kein oder nur ein weiteres C-Atom und ist in der Regel ein Alanin. Aufgrund der zwei verschiedenen Regionen in der Signalsequenz schlug INOUYE folgenden Mechanismus vor: (1) Der positiv geladene, basische Anfang der Signalsequenz bindet das Protein und damit auch die Ribosomen durch ionische Wechselwirkungen an die durch Phospholipide negativ geladene Oberfläche der inneren Membran. (2) Während die hydrophile Region an der Innenseite der Membran hängenbleibt, schiebt sich die anschließende hydrophobe Region der Signalsequenz in die Membran hinein und bildet daher eine Schleife (loop). (3) Mit fortschreitender Proteinsynthese erreicht die Schleife mit der Spaltstelle des Signalpeptids die Membranaußenseite,wo eine Protease die Signalsequenz abspaltet. Diese Signalpeptidase benötigt Alanin oder eine andere Aminosäure mit kurzer Seitenkette, um die Spaltstelle zu erkennen.
Sowohl die Signalhypothese als auch das loop-Modell fordern, daß das Vorläuferprotein co-translationell, d.h. obligatorisch an die Proteinsynthese gekoppelt in die Membran eingelagert bzw. durch sie hindurch transportiert wird. Im Fall des Phagen M13 allerdings wird das Haupt-Hüllprotein, das sich während der Phagenreifung in der inneren Membran befindet, als löslicher Vorläufer gebildet, der sich erst post-translationell in die Membran ein-

lagert, wobei das Signalpeptid abgespalten wird (63,131). Diese Beobachtungen veranlaßten WICKNER eine von den bereits geschilderten Theorien abweichende Hypothese aufzustellen: die "Membran-Trigger-Hypothese" (131). In diesem Modell wird der Signalsequenz eine andere Rolle zugewiesen: sie soll der wachsenden Polypeptidkette ermöglichen, sich in eine Konformation zu falten, die im wässrigen Medium stabil ist. Der Kontakt mit den Lipidkomponenten einer geeigneten Membran, noch während der Synthese oder erst im Anschluß daran, führt dann dazu, daß sich das Protein in seiner Konformation umorientiert, so daß hydrophobe Reste nach außen gerichtet sind. Die bei der Konformationsänderung freiwerdende Energie ist dabei für die Einlagerung des Proteins in die Membran bzw. für die Translokation über die Membran verantwortlich, wobei die Abspaltung der Signalsequenz den Vorgang irreversibel macht.

Während bei der Signalhypothese das Ribosom fest an die Membran binden muß, damit die wachsende Polypeptidkette durch die Membran geschoben werden kann, ist dies für das loop-Modell oder die Membran-Trigger-Hypothese nicht notwendig. Im Fall des loop-Modells erfolgt eine Fixierung durch die hydrophile Anfangssequenz des Signalpeptids, wobei das so fixierte Protein dann durch die fortlaufende Proteinsynthese in die Membran geschoben werden kann. Bei der Membran-Trigger-Hypothese wird das Protein durch eine Konformationsänderung in die Membran "gedrängt". In beiden Fällen muß also das Ribosom mit der wachsenden Polypeptidkette nicht fest an die Membran gebunden sein, vielmehr genügt allein die Fixierung über die wachsende Proteinkette. Einen Hinweis dafür lieferten SMITH et al. (120), die zeigen konnten, daß der größte Teil der membrangebundenen Polysomen von Escherichia coli durch Puromycin von der Membran abgelöst werden kann.

Die entscheidende Rolle der Signalsequenz für die Sekretion eines Proteins konnte mit Hilfe der von CASADABAN (24) und BECKWITH et al. (11,116) entwickelten Gen-Fusionstechnik gezeigt werden. Mit dieser Technik ist es möglich,das

für die Synthese des cytoplasmatischen Enzyms ß-Galactosidase verantwortliche Gen (lacZ) mit Genen für bestimmte sekretorische Proteine von Escherichia coli zu fusionieren. Das Resultat solcher Fusionen sind Proteine, bei denen der NH_2-Terminus der ß-Galactosidase durch verschieden lange, NH_2-terminale Sequenzen eines periplasmatischen oder äußeren Membranproteins ersetzt ist. Oft besitzen solche Hybridproteine noch ß-Galactosidase-Aktivität, so daß ihre Lokalisation in der Zelle leicht verfolgt werden kann. Mit der beschriebenen Genfusions-Technik konnten Hybridproteine der ß-Galactosidase erzeugt werden, die NH_2-terminale Sequenzen des periplasmatischen Maltose-Bindeproteins (10) und des lamB Proteins (116) aus der äußeren Membran enthielten. Obwohl bestimmte durch Mutationen in der Signalsequenz hervorgerufene Aminosäuresubstitutionen den Export von Hybridproteinen verhindern (10, 15,37,39,58), scheint auf der anderen Seite die Signalsequenz für die Sekretion eines Proteins allein nicht auszureichen (11,82). In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von KOSHLAND & BOTSTEIN (68) von Interesse, die zeigt, daß zumindest für die periplasmatische ß-Lactamase der COOH-Terminus des Proteins für die Sekretion benötigt wird, denn Mutanten des bla-Gens für die TEM ß-Lactamase, denen ca. 10-50% der Aminosäuren am COOH-Terminus fehlten, häuften den Vorläufer des Enzyms im Cytoplasma an. Die von WICKNER postulierte spezifische Faltung und die nachfolgende Konformationsänderung kann diese Beobachtung am besten erklären.

Wie die äußeren Membranproteine nach ihrer Passage durch die Cytoplasmamembran die äußere Membran erreichen, ist ungeklärt. Einen Hinweis könnten die von BAYER (12) elektronenmikroskopisch beobachteten Adhäsionsstellen zwischen innerer und äußerer Membran liefern, über die Kapselpolysaccharide (13), das Lipopolysaccharid (86) und wahrscheinlich auch die Matrixproteine von Salmonella typhimurium (118) in die äußere Membran gelangen.

Dieser kurze Abriß über die zur Zeit diskutierten Modelle zur Proteinsekretion konnte nur exemplarisch die Vielzahl

von Befunden andeuten, die für oder wider die eine oder die andere Hypothese sprechen. Es ist gut möglich, daß keine der geschilderten Hypothesen allgemeine Gültigkeit hat, sondern daß nur eine Kombination der verschiedenen Modelle die wirklichen Vorgänge erklären kann. Auch die Möglichkeit, daß für verschiedene Proteine der äußeren Membran verschiedene Mechanismen existieren, darf nicht außer Acht gelassen werden.

Als diese Arbeit über den Vorläufer des OmpA Proteins begonnen wurde, war die Signalsequenz eines Membranproteins von Escherichia coli nur im Fall des Lipoproteins bekannt (61). Für das OmpA Protein war lediglich die Existenz eines Vorläufers erwiesen (47,105,115). Das Ziel dieser Arbeit war deshalb Folgendes: den Vorläufer des OmpA Proteins eingehend und möglichst in vivo zu charakterisieren und nach seiner Isolierung die Primärstruktur der Signalsequenz aufzuklären. Besonders die Charakterisierung in vivo erschien von großem Interesse, da der Vorläufer bis dahin nur unter semi-in vitro Bedingungen gefunden wurde, die zu einer anomalen Architektur der äußeren Membran führten, wie z.B. durch Behandlung mit Toluol (48,115), Phenäthylalkohol (47) oder Erniedrigung der Membranfluidität (105). Neben der eingehenden Charakterisierung des Vorläufers in vitro und in vivo konnte auch die unterdessen auf DNA -Ebene ermittelte Primärstruktur der Signalsequenz (14,83) bestätigt werden.

Eine genaue Kenntnis der Eigenschaften des Vorläufers, insbesondere bezüglich seiner Lokalisation in der Zellhülle, seiner Konformation und der Kinetik der Signalabspaltung, sollte zu einem besseren Verständnis der Sekretionsvorgänge prokaryontischer Membranproteine führen.

II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

II.1 Stämme und Plasmide

Folgende Stämme von E. coli K-12 wurden verwendet:

Stamm	Herkunft (Referenz)	Genotyp
UH 100	W 620 von H.U.SCHAIRER (33)	thi, pyrD, gltA, galK, str, trp, recA, ompA[a]
P 400	P.REEVES (117)	thi, thr, leu, argE, proA, str, non, mtl, xyl, ara, galK lacY, supE
P 400-6	U.HENNING (110)	s. P 400, aber entweder ompB oder ompC
X 984[b]	R.CURTISS (72)	minA, minB, purE, pdx
JC 3272	M.ACHTMAN (3)	his, trp, lys, gal, lac, str, tsx

Tab.2 E. coli Stämme. Die genetische Nomenklatur richtet sich nach BACHMANN et al. (9). Enthalten Stämme zusätzlich ein Plasmid, so wurde dies extra vermerkt, z.B. UH 100/pTU 100.Stämme mit Derivaten von pSC 101 wurden mit 10µg/ml Tetracyclin im entsprechenden Medium angezogen. [a]Die ompA-Mutation entstand durch Selektion auf Resistenz gegen den Phagen K3h1 (78). [b]X 984/pTU 100 ist zusätzlich $OmpA^-$, $OmpC^-$ und $OmpF^-$ (43).

Mit folgenden Plasmiden wurde gearbeitet:

Plasmid	Charakterisierung (Ref.)	kodiert für:
pTU 100	OmpA Gen in pSC 101 kloniert (54)	Wildtyp-OmpA Protein
pTU 105	Mutantenallel 32 von pTU 100	OmpA Protein mit langsamerer elektrophoret. Beweglichkeit ("pTU 105-Protein")
pTU 202	EcoRI-Fragment mit Insertion 72 aus pTU 100 in pBR 325 kloniert (14)	reduzierte Mengen an Wildtyp-OmpA Protein

Tab.3 Charakterisierung der verwendeten Plasmide.

II.2 Medien und Puffer

LB-MEDIUM	pro l
Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g

LB/TET-MEDIUM
wie LB-Medium, jedoch zusätzlich 10µg/ml Tetracyclin

MC-MEDIUM	pro l
Zitronensäure x H_2o	1.6 g
K_2HPO_4 (wasserfrei)	8.0 g
$NH_4H_2PO_4$ (wasserfrei)	1.6 g
$MgSO_4$ x 7 H_2o	0.2 g
NaOH	o.6 g

M9-MEDIUM

Na_2HPO_4 x 2 H_2o	42.0 mM
KH_2PO_4 (wasserfrei)	22.0 mM
NH_4Cl	18.7 mM
NaCl	8.5 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O*	1.0 mM
$CaCl_2$ (wasserfrei)*	0.1 mM
Glucose*	0.4 %

*einzeln autoklaviert

TT-MEDIUM	pro l
KH_2PO_4 (wasserfrei)	5.6 g
K_2HPO_4 (wasserfrei)	29.0 g
Hefe-Extrakt	10.0 g
Thiamin	15.0 mg
Glucose*	40.0 ml einer 25%igen Lösung

*nach dem Autoklavieren zugegeben

PUFFER A

Tris-Acetat pH 8.2	10 mM
Magnesium-Acetat	14 mM
Kalium-Acetat	60 mM
DTT	1 mM

LÖSUNG B

Tris-Acetat pH 8.2	170.0 mM
Magnesium-Acetat	4.8 mM
ATP	1.4 mM
PEP	15.5 mM
Pyruvat-Kinase	3.46 µg/ml
DTT	2.1 mM
L-Aminosäuren	je 13.8 mM

GEMISCH C

Tris-Acetat pH 8.2	180.0 mM
Kalium-Acetat	220.0 mM
Ammonium-Acetat	108.0 mM
$CaCl_2$ (wasserfrei)	30.0 mM
DTT	5.6 mM
ATP (Dinatrium-Salz)	8.8 mM
CTP (Trinatrium-Salz)	2.1 mM
GTP (")	2.1 mM
UTP (")	2.1 mM
PEP	84.0 mM
t-RNA aus E. coli	400.0 µg/ml
Leucovorin	108.0 µg/ml

TE-PUFFER

Tris-HCl pH 7.4	10 mM
EDTA (Na_2-Salz)	1 mM

PBS/AZID-PUFFER

Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.4	40 mM
NaCl	150 mM
Na-Azid	0.05% (w/v)

II.3 Chemikalien

Sofern nicht besonders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Amersham/Buchler, Braunschweig	^{35}S-Methionin
	^{35}S-Cystein
	^{3}H-Isoleucin
	^{14}C-Lysin
Boehringer, Mannheim	Adenosin
	Tetracyclin
	Trypsin-Inhibitor (aus Hühnereiweiß)
	PEP
	Pyruvat-Kinase
	Lysozym (aus Hühnereiweiß)
	t-RNA (aus E. coli MRE 600)
Calbiochem, San Diego	DTT
	L-Aminosäuren
Difco Laboratories, Detroit	Trypton
	Hefe-Extrakt
	Methionine-Assay-Medium
Fluka, Buchs	Acrylamid
Geigy, Basel	Sarkosyl NL 97
Miles, Frankfurt	V8-Protease (aus Staphylococcus aureus)
New England Nuclear, Boston	En^{3}Hance
Schwarz/Mann, Orangeburg	Coomassie-Blau
Serva, Heidelberg	EDTA (Na_2-Salz)
	Triton X-100
	SDS
	Leucovorin (aus Leuconostoc mesenteroides)
	Pronase (aus Streptomyces griseus, 45 000 PUK-Einheiten/mg)

Sigma, München	TLCK
	CTP (Trinatrium-Salz)
	UTP (" -)
Zinsser, Frankfurt	Omnifluor
	Unisolve

II.4 Allgemeine Methoden

II.4.1 Messung der Zelldichte

Die Zellen wurden in speziellen Kolben angezogen, die für die Messung der optischen Dichte in einem Klett-Summerson-Kolorimeter vorgesehen waren.

II.4.2 Präparation von Zellhüllen

10 ml Zellkultur (~10^9 Zellen/ml) wurden abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen, in 6 ml Wasser resuspendiert und mit einem Ultraschallgerät (Branson Instruments Inc.) im Eisbad beschallt (4 x 30 Sek. mit je 30 Sek. Kühlpause). Das Sonikat wurde 1 Std. bei 100 000 g zentrifugiert und der Membranniederschlag zweimal mit Wasser gewaschen, wobei jeweils wieder 1 Std. bei 100 000 g zentrifugiert wurde.

II.4.3 Immunfällung

Die Immunfällung des OmpA Proteins erfolgte mit Kaninchenserum, das gegen OmpA Protein aus E. coli K-12 Stamm P 400 gewonnen wurde (56). Zellhüllen zur Immunfällung wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7.4/1% SDS/1% (v/v) Mercaptoäthanol/10% (v/v) Glycerin oder in Probenpuffer für die SDS-PAGE (s.II.4.5) 5 Min. gekocht.(Sollte die Immunfällung mit einer Lösung durchgeführt werden, die kein SDS enthielt, wie z.B. mit Sonikaten nach Ultraschallbehandlung, dann wurde SDS ad 2% zugegeben und 5 Min. gekocht).100 µl, die Zellhüllen von max. 5 x 10^7 Zellen bzw. 10^9 Minizellen enthielten, wurden mit 500 µl 10 mM Tris-HCl pH 7.4 verdünnt und mit 75 µl Antiserum versetzt. Der Verdünnungsschritt war notwendig, um die optimale SDS-Konzentration zu erreichen, bei der sich sowohl Immunkomplexe bilden konnten, als auch das Protein in Lösung

blieb. Nach 1 Std. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl einer 10% (w/v) Suspension von Staphylococcus-Zellen Stamm Cowan I (s.II.4.4) zugegeben und für weitere 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 10 mM Tris-HCl pH 7.4/0.1 mM EDTA/0.02% SDS (Waschpuffer) wurde in 50 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE (s.II.4.5) für 5 Min. gekocht und die Staphylococcus-Zellen in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert.

II.4.4 Präparation der Staphylococcus-Zellen für die Immunfällung

Staphylococcus aureus Cowan I wurde nach KESSLER (67) in Penassay-Medium (Difco)/5 mg/ml ß-Glycerophosphat/2.5 mg/ml Hefe-Extrakt/4 µg/ml Nicotinsäure/2 µg/ml Vitamin B_1 angezogen, in PBS/Azid-Puffer zweimal gewaschen und als 10%ige (w/v) Suspension in PBS/Azid-Puffer 1.5 Std. bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 1.5% (v/v) Formaldehyd gerührt. Nachdem die Zellen einmal mit PBS/Azid-Puffer gewaschen worden waren, wurden sie als 10%ige (w/v) Suspension in PBS/Azid-Puffer aufgenommen, 5 Min. bei 80°C gerührt, sofort im Eisbad abgekühlt und zweimal mit PBS/Azid-Puffer gewaschen. Als 10%ige (w/v) Suspension in PBS/Azid-Puffer/20% Glycerin bei -70°C eingefroren sind die Zellen über Monate haltbar. Unmittelbar vor Gebrauch wurden sie zweimal mit Waschpuffer (s.II.4.3) gewaschen, 5 Min. in Waschpuffer + 2% SDS gekocht, zweimal mit Waschpuffer + 0.2% SDS gewaschen und zu einer 10%igen (w/v) Suspension in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 aufgenommen.

II.4.5 SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer von STUDIER (123) und AMES (6) beschriebenen Apparatur für Flachgele. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt. Sammelgel: 5% Acrylamid/0.14% Bisacrylamid (Verh.30:0.8)/62.5 mM Tris-HCl pH 6.8/0.1% SDS/0.15% (v/v) TEMED/0.025% Ammoniumperoxodisulfat. Trenngel: 12% Acrylamid/0.32% Bisacrylamid (Verh. 30:0.8)/37.5 mM Tris-HCl pH 8.8/0.1% SDS/0.15%(v/v) TEMED/ 0.025% Ammoniumperoxodisulfat. Als Elektrophoresepuffer wurde verwendet: 25 mM Tris-HCl pH 8.3/0.19 M Glycin/0.1% SDS.

Die Proben wurden in folgendem Puffer 5 Min. gekocht und danach aufgetragen: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8/10% (v/v) Glycerin/2% SDS/5% (v/v) Mercaptoäthanol/0.001% Bromphenolblau (=Probenpuffer für die SDS-PAGE). Die Elektrophorese wurde bei 4°C, für das Trenngel mit 120 Volt und 28 mA/Flachgel durchgeführt. Dauer 5-6 Std. Anschließend wurden die Gele 1Std. lang mit 45% (v/v) Methanol/9% (v/v) Essigsäure/0.25% Coomassie-Blau gefärbt und dann mit 0.5% (v/v) Methanol/7.5% (v/v) Essigsäure entfärbt.

II.4.6 Autoradiographie und Fluorographie

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese zunächst 30 Min. in Entfärberlösung (s.II.4.5) fixiert, für 1 Std. in En^{3}Hance (New England Nuclear) geschüttelt und für weitere 30 Min. in Wasser, um den wasserunlöslichen Szintillator im Gel auszufällen. Das aktivierte Gel wurde dann auf Filterpapier mit einem Geltrockner (Hoefer Scientific Instruments) getrocknet. Zur Fluorographie bzw. direkt im Anschluß an die Elektrophorese wurde das getrocknete Gel auf einen Röntgenfilm (Kodak XR -5) gelegt und in einer lichtdichten Kassette bei -70°C exponiert.

II.4.7 Szintillationszählung von radioaktiven Gelstückchen

99 ml Perhydrol (=30% H_2O_2) wurden im Eisbad mit 1 ml konz. NH_4OH versetzt und davon je 500 µl zu den Gelstückchen in Szintillationsfläschen aus Glas gegeben. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt und dann 10 ml Unisolve (Zinsser) zugegeben. Nach 30-minütigem Schütteln bei 37°C konnten die Proben gezählt werden.

II.4.8 Präparation der Minizellen

II.4.8.1 Anfertigen der Sucrosegradienten

Eine Sucrose-Lösung von 20% wurde mit LB-Medium angesetzt, in Cellulosenitrat-Röhrchen bei -20°C eingefroren und über Nacht langsam im Kühlraum aufgetaut (2). Dabei stellt sich ein annähernd kontinuierlicher Gradient ein, der für die Trennung der Minizellen von den großen Mutterzellen ausreicht.

II.4.8.2 Isolierung der Minizellen

5 l LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin (=LB/Tet-Medium) wurden mit einer Übernachtkultur von χ 984 mit dem Plasmid pTU 100 (14,54) angeimpft und zur späten log-Phase hochgezogen. Die Zellen wurden einmal mit LB/Tet-Medium gewaschen, in 20 ml LB/Tet-Medium resuspendiert und in 5 ml Portionen auf einen 50 ml Sucrosegradienten (s.II.4.8.1) aufgetragen. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 5000 rpm in einem Beckman SW25-2 Ausschwingrotor wurde die Minizellbande von dem Zellniederschlag durch Absaugen mit einer Spritze getrennt, 1:3 mit LB/Tet-Medium verdünnt, bei 20 000 g zentrifugiert und die auf diese Weise vorgereinigten Minizellen in 5 ml LB/Tet-Medium resuspendiert. Nach der zweiten Zentrifugation auf einem Sucrosegradienten wurden die Minizellen einmal in MC-Medium gewaschen, im gleichen Medium zu einer OD_{620}=6.0 (=2 x 10^{10} Minizellen/ml) aufgenommen, ad 30% (v/v) mit Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. In dieser Form sind die Minizellen über Jahre zur Plasmid-abhängigen Proteinsynthese brauchbar.

II.4.8.3 Markierung der Minizellen mit ^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein

100 µl Minizellsuspension wurden langsam im Eisbad aufgetaut, einmal mit MC-Medium gewaschen, im gleichen Volumen MC-Medium mit 0.4% Glucose und 500 IE/ml Penicillin aufgenommen und mit 5 µl Methionine-Assay-Medium (Difco, 100 µg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Minizellen mit 10 µCi ^{35}S-Methionin/2 x 10^9 Minizellen (Amersham/Buchler, 1000 Ci/mmol) 1Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert, zweimal mit MC-Medium gewaschen und 5Min. in 100 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE (s.II.4.5) gekocht. Sollten die Minizellen mit ^{35}S-Cystein markiert werden, wurden an Stelle des komplexen Methionine-Assay-Mediums entsprechend den Wachstumsbedürfnissen des Minizellstammes folgende Substanzen zugegeben: Adenosin, Pyridoxin (beide 10 µg/ml); Histidin, Isoleucin, Valin und Methionin (alle 20 µg/ml).

Sonst verlief die Markierung wie für ^{35}S-Methionin beschrieben.

II.4.8.4 Präparation von Zellhüllen aus Minizellen

Anfänglich wurden die Minizellen nicht sofort in Probenpuffer gekocht, sondern die Zellhüllen isoliert. Dies stellte sich später als überflüssig heraus, denn isolierte Zellhüllen und ganze Minizellen zeigten, in Probenpuffer für die SDS-PAGE gekocht, dasselbe radioaktive Proteinmuster. Im Wesentlichen wurde die gleiche Methode benützt, wie in II.4.8.3 beschrieben: 500 µl Minizellsuspension wurden mit ^{35}S-Methionin markiert und nach dem Waschen in 6 ml Wasser ultrabeschallt. Da die kleinen Minizellen im Ultraschall sehr stabil sind, mußte besonders ausführlich beschallt werden (10 x 30 Sek. mit je 30 Sek. Kühlpausen). Die Zellhüllen-Präparation verlief dann, wie in II.4.2 beschrieben.

II.4.9 Konstruktion von Plasmidmutanten des OmpA Gens

Die Plasmidmutanten pTU 105 und pTU 202 (s.Tab.3) wurden in unserem Labor aus UH 100/pTU 100 isoliert und charakterisiert, wie für pTU 104 von BREMER et al. (22) beschrieben.

II.5 Charakterisierung des pro-OmpA Proteins in Minizellen

II.5.1 Partielle Proteolyse mit Staphylococcus V8-Protease und Chymotrypsin

Im Wesentlichen wurde nach einer Methode von CLEVELAND et al. (30) vorgegangen. Minizellen wurden, wie oben beschrieben, mit ^{35}S-Methionin markiert und die radioaktiven Proteine auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Um eine eventuelle saure Hydrolyse zu vermeiden, wurde das Gel nur 15 Min. mit Coomassie-Blau gefärbt, 15 Min. entfärbt und dann über Nacht bei 4°C in H_2O bidest. geschüttelt, um Essigsäure und Methanol zu entfernen. Für die Proteolyse wurde ein SDS-Polyacrylamidgel (15% Acrylamid/0.4% Bisacryl-

amid, sonst wie in II.4.5) mit einem etwas längeren Sammelgel (3 cm) verwendet. Die gefärbten Banden von Vorläufer und OmpA Protein wurden mit einem Rasiermesser aus dem ersten Gel ausgeschnitten, auf die Breite der Taschen des Proteolyse-Gels (5 mm) zurechtgetrimmt und für 30 Min. in 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8/0.1% SDS/1 mM EDTA/0.1 mM Mercaptoäthanol (für die Chymotrypsin-Verdauung ohne Mercaptoäthanol) geschüttelt. Dann wurden die Gelstückchen in die Taschen des Proteolyse-Gels gesetzt, mit einem Spatel auf den Grund der Taschen geschoben und mit 10 µl von obigem Tris-Puffer + 20% (v/v) Glycerin überschichtet. Zuletzt wurden 5 µl der entsprechenden Protease-Lösung (versch. Konz.s.Abb.3) in die Taschen pipettiert. V8-Protease wurde in 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8/1% SDS/1 mM EDTA/2.5% (v/v) Mercaptoäthanol/10% (v/v) Glycerin/0.001% Bromphenolblau bei Raumtemperatur gelöst; Chymotrypsin im gleichen Puffer, jedoch ohne Mercaptoäthanol. Die Elektrophorese wurde in der üblichen Weise, aber bei Raumtemperatur durchgeführt, mit der Ausnahme, daß der Strom für 45 Min. (V8-Protease) bzw. für 1.5 Std. (Chymotrypsin) abgeschaltet wurde, nachdem das Bromphenolblau die Hälfte des Sammelgels durchlaufen hatte. Während dieser Zeit erfolgte die Proteolyse. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Papier getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

II.5.2 Lösen der Proben für die SDS-PAGE

Proben für die SDS-PAGE wurden normalerweise in Probenpuffer für 5 Min. gekocht. Für die Versuche zur Hitzemodifizierbarkeit wurden die Proben entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder 1 Std. bei 50°C in Probenpuffer für die SDS-PAGE gelöst.

II.6 Versuche zur Anreicherung in vivo des pro-OmpA Proteins

II.6.1 Radioaktive Markierung von Minizellen in Anwesenheit von Procain, TLCK und PAB

100 µl Minizellsuspension wurden mit ^{35}S-Methionin markiert (s.II.4.8.3) und für die SDS-PAGE vorbereitet. Das

Markierungsgemisch enthielt zusätzlich 100 mM Procain bzw. 1 mg/ml TLCK oder 25 mM PAB.

II.6.2 Test auf Phagenempfindlichkeit in Anwesenheit von Procain

P 400 wurde über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit oder ohne 200 mM Procain angezogen und am nächsten Morgen auf Platten (LB-Medium) mit oder ohne 200 mM Procain ausgestrichen. Auf den Ausstrich wurden Verdünnungsreihen von verschiedenen Suspensionen des Phagen Tu II* (Rezeptor: OmpA Protein) aufgetropft: 4×10^4; 4×10^7; 4×10^8 und 4×10^9 Phagen/ml. Nach ca. 8 Std. konnten Resistenz bzw. Sensitivität anhand der Plaque-Bildung ausgewertet werden. Der Phage Tu II* wurde in diesem Labor von Frau I. Becker aus einem Platten-Lysat von P 400 präpariert.

II.6.3 Sphäroplastenbildung

10 ml Kultur in LB/Tet-Medium wurde bei 37°C zu einer Dichte von 5×10^8 Zellen/ml hochgezogen, abzentrifugiert,einmal in MC-Medium gewaschen und in 10 ml MC-Medium/0.4% Glucose/10 µg/ml Tetracyclin 3 Std. bei 37°C geschüttelt (Kontrolle) bzw. nach 15-minütigem Schütteln bei 37°C in 10 ml MC-Medium/0.4% Glucose/10 µg/ml Tetracyclin/12% Sucrose/0.2% $MgCl_2$ durch Zugabe von 500 IE/ml Penicillin 3 Std. bei 37°C (Schüttler) sphäroplastiert. Die Sphäroplastenbildung wurde im Mikroskop überwacht.

II.6.4 Triton X-100 Extraktion bei Minizellen

Aus 500 µl Minizellsuspension wurden Zellhüllen präpariert (s.II.4.8.4) und entweder in 600 µl 10 mM Tris-HCl pH 7.4/2% Triton X-100 oder in 600 µl Tris-Puffer/2% Triton X-100 + 0.1 mM bzw. 5 mM $MgCl_2$ aufgenommen. Nach 30-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Triton-unlöslichen Membranteile bei 100 000 g für 1 Std. abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und in 100 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen. Der Triton-lösliche Überstand wurde mit 95% (v/v) Aceton über

Nacht im Kühlraum gefällt, zweimal mit Aceton gewaschen und ebenfalls in 100 µl Probenpuffer gelöst.

II.6.5 Sarkosyl-Extraktion bei Minizellen

Von 500 µl Minizellsuspension wurden Zellhüllen isoliert (s.II.4.8.4), jedoch ohne radioaktiv zu markieren. Diese Zellhüllen wurden in 600 µl 10 mM Tris-HCl pH 7.4/1.5% Sarkosyl NL 97 mit oder ohne $MgCl_2$ extrahiert, wie in II.8.2 für Zellhüllen aus normalen Bakterienzellen beschrieben. Sarkosyl-lösliche und -unlösliche Fraktionen wurden in 300 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

II.7 Isolierung des pro-OmpA Proteins aus Minizellen

II.7.1 Säulenchromatographische Methoden

II.7.1.1 Trennung mit Sephacryl S-200 Superfine

Von 2.5 ml Minizellsuspension wurden in der beschriebenen Weise (s.II.4.8.4) Zellhüllen präpariert und über Nacht bei 37°C in 1 ml 62.5 mM Tris-HCl pH 7.4/1 mM EDTA/1% SDS/ 0.5% (v/v) Mercaptoäthanol/0.01% Na-Azid gelöst. Eine Säule (1.5 cm x 90 cm) wurde mit Sephacryl S-200 Superfine (Pharmacia) in obigem Puffer äquilibriert (Fließgeschw. 50-60 µl/Min.) und 300 µl Dextranblau 2000 (Pharmacia, 2 mg/ml) aufgetragen. Nachdem der Farbstoff in das Gel gelaufen war, wurde die Zellhüllenprobe aufgetragen und die Elution der Proteine mit einem Durchfluß-Spektrometer (Isco) bei 280 nm verfolgt. Die einzelnen Gipfelfraktionen wurde auf mehrere Weisen für die SDS-PAGE vorbereitet: 1.) 1:1 mit Probenpuffer für die SDS-PAGE verdünnt und 5 Min. gekocht; 2.) mit 95% (v/v) Aceton gefällt, gewaschen und in Probenpuffer gekocht; 3.) 2 Tage gegen 1% SDS dialysiert und dann mit 95% (v/v) Aceton gefällt, gewaschen und in Probenpuffer gekocht.

II.7.1.2 Trennung mit Ultrogel AcA 54

500 µl Minizellsuspension wurde mit ^{35}S-Methionin markiert (s.II.4.8.3) und davon zusammen mit 2 ml unmarkierter

Minizellsuspension Zellhüllen isoliert (s.II.4.8.4). Diese Zellhüllen wurden in 2 ml 62.5 mM Tris-HCl pH 7.4/2% SDS über Nacht bei Raumtemperatur gelöst und auf eine Säule (1.5 cm x 150 cm) mit Ultrogel AcA 54 (LKB) in 62.5 mM Tris-HCl pH 7.4/1% SDS zusammen mit 0.1 mg/ml Dextranblau 2000 aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 50 µl/Min; die Elution wurde mit einem Durchfluß-Spektrometer (Isco) bei 280 nm verfolgt. Je 50 µl der einzelnen Fraktionen wurden auf Millipore-Filter pipettiert, getrocknet und in 5 ml Omnifluor (Zinsser) in einem Szintillationszähler gezählt. Der Rest der Fraktionen wurde entsprechend der Radioaktivitätsgipfel vereinigt, 2 Tage gegen 1% SDS dialysiert, anschließend lyophilisiert, zweimal mit Aceton gewaschen und in Probenpuffer für die SDS-PAGE gekocht.

II.7.2 Proteinelution aus einem SDS-Polyacrylamidgel

II.7.2.1 Radioaktive Markierung der Minizellen

Je 1 ml Minizellsuspension wurde mit 50 µCi ^{35}S-Methionin (1000 Ci/mmol) bzw. 500 µCi ^{3}H-Isoleucin (40 Ci/mmol) oder 200 µCi ^{14}C-Lysin (340 mCi/mmol; alle von Amersham/Buchler) markiert (s.II.4.8.3), wobei für die ^{3}H-Isoleucin- und die ^{14}C-Lysin Markierung statt des Methionine-Assay-Mediums folgende Substanzen entsprechend den Wachstumsbedürfnissen des Minizell-Stammes zugegeben wurden: Adenosin; Pyridoxin (beide 10 µg/ml); 1 µg/ml Thiamin und 0.2 mM L-Aminosäuren ohne Isoleucin bzw. Lysin. Nach 1 Std. Inkubation bei 37°C (Schüttler) wurden die Minizellen in MC-Medium gewaschen, anschließend in 1 ml Probenpuffer für die SDS-PAGE 5 Min. gekocht, in 20 µl Portionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden des pro-OmpA Proteins wurden aus dem Gel herausgeschnitten und durch Elektro-Elution (s.II.7.2.3) isoliert.

II.7.2.2 Extraktion des Coomassie-Blau aus dem SDS-Polyacrylamidgel

Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden unzerkleinert mehrere Male bis zur vollständigen Entfärbung in 10% Trichloressigsäure/30% (v/v) Äthanol bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Trichloressigsäure wurde anschließend entfernt, indem man 30 Min. bei Raumtemperatur in 30% (v/v) Äthanol schüttelte.

II.7.2.3 Elektro-Elution

Die Elektro-Elution wurde in einem Gerät der Firma Isco (Abb.1 und Ref.4) durchgeführt,wobei die entfärbten Gelstückchen in die Kammer 1 des Elektrophorese-Einsatzes gelegt wurden. Der Einsatz wurde mit 2.5 mM Tris-HCl pH 8.3/0.19 M Glycin/0.1% SDS gefüllt und die Elektrophorese-Wanne mit demselben Puffer, der aber statt 2.5 mM 25 mM Tris-HCl pH 8.3 enthielt. Nach ca. 5-6 Std. bei 3 Watt war die Elution beendet und das eluierte Protein wurde aus Kammer 3 des Elektrophorese-Einsatzes gesaugt.

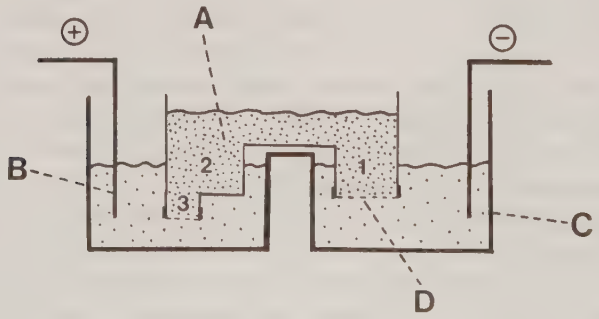


Abb.1 Schema des Elektro-Elutionsgerätes. A Elektrophorese-Einsatz; B Elektrode; C Elektrophorese-Wanne; D Dialysemembran

II.7.2.4 Sequenzierung nach Edman

4 mg unmarkiertes, lyophilisiertes OmpA Protein wurde in 500 µl 0.5 M $NaHCO_3$ pH 9.8 (mit NaOH eingestellt)/1% SDS für 5 Min. gekocht, ad 1 ml Endvolumen mit dem eluierten Vorläuferprotein vereinigt und 2 Tage gegen obigen Puffer dialysiert, um den Elektrophorese-Puffer, in dem der Vorläufer gelöst war, zu entfernen. Die Sequenzierung erfolgte nach EDMAN (36). Der Ansatz wurde mit 20 µl Phenylisothiocyanat (PITC) versetzt, 3 Std. bei 50°C gerührt (Kopplung des PITC an die NH_2-terminale Aminosäure) und anschließend mit 90% (v/v) Aceton gefällt (30 Min. im Eisbad). Der Niederschlag wurde zweimal mit Aceton gewaschen und in vacuo getrocknet. Das resultierende Phenylthiocarbamylpeptid wurde mit 400 µl konz. Trifluoressigsäure versetzt (15 Min. bei 40°C), wobei die NH_2-terminale Aminosäure abgespalten wird und mit dem PITC-Rest cyclisiert. Nachdem die Trifluoressigsäure mit N_2 bei 50°C abgeblasen worden war, wurde das Reaktionsgemisch zweimal mit je 2 ml Dichloräthan eluiert. Der Rückstand, der das um eine Aminosäure verkürzte Peptid enthält, wurde in 800 µl H_2O bidest. aufgenommen, mit 800 µl 20% Trichloressigsäure im Eisbad ausgefällt und der Niederschlag mit Aceton gewaschen. In $NaHCO_3$-Puffer gelöst (s.o.), wurde er dann für den nächsten Abbauschritt verwendet. Das Dichloräthan aus dem Elutionsschritt wurde mit N_2 abgedampft und mit 200 µl 20%iger (v/v) Trifluoressigsäure für 10 Min. bei 80°C behandelt. Dabei entsteht aus dem cyclischen Produkt die Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-Aminosäure),die über eine Dowex 50-Säule mit Methanol gereinigt wurde. Nachdem die gereinigte PTH-Aminosäure eingetrocknet worden war, wurde sie,in 20 µl Essigsäureäthylester gelöst, auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator (60 F_{254}, Merck) getüpfelt und zuerst mit Heptan/Propionsäure/Dichloräthan (58:17:25) und dann mit Heptan/Butanol/75% (v/v) Ameisensäure (56:34:10) in der gleichen Dimension chromatographiert. Als Referenz wurde immer das PTH-Derivat derjenigen Aminosäure aufgetragen, mit der das Protein radioaktiv markiert war. Unter dem UV-Licht wurde der Fleck der entsprech-

enden PTH-Aminosäure notiert.
Szintillationszählung: Der markierte Flecken wurde von der Dünnschichtplatte gekratzt, mit 1 ml H_2O bidest. versetzt und nach Zugabe von 10 ml Unisolve (Zinsser) gezählt.

II.8 Charakterisierung von UH 100/pTU 100 und seiner Plasmidmutante pTU 105

II.8.1 Osmotischer Schock

Es wurde nach der von NEU & CHOU (89) beschriebenen Methode vorgegangen: 20 ml einer spät-logarithmischen Kultur in LB-Medium wurden abzentrifugiert, zweimal in 0.9% NaCl gewaschen, in 5 ml 30 mM Tris-HCl pH 7.3/20% Sucrose resuspendiert und unter ständigem Rühren mit EDTA zu einer Endkonzentration von 0.1 mM versetzt. Nach 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert, in 2.5 ml 0.5 mM $MgCl_2$ resuspendiert und für weitere 15 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Eine mikroskopische Kontrolle zeigte, daß unter diesen Bedingungen keine Lyse eintrat. Die so geschockten Zellen wurden bei 20 000 g abzentrifugiert. Von den abzentrifugierten Zellen wurden Hüllen präpariert (s.II.4.2), während der Überstand (=osmotische Schockflüssigkeit) mit 10% Trichloressigsäure gefällt, zweimal mit Aceton gewaschen und anschließend in 100 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE gekocht wurde. Zusammen mit den in 100 µl Probenpuffer gekochten Zellhüllen wurde die Schockflüssigkeit auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

II.8.2 Sarkosyl-Extraktion normaler Zellen

Es wurden Zellhüllen präpariert (s.II.4.2) und die Gesamtmembranen, die 100 ml Kultur entsprachen, in 1.5 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.4 aufgenommen. Die Kontrolle enthielt nur 1.5 ml Tris-Puffer, die anderen Proben zusätzlich 1.5% Sarkosyl NL 97 bzw. 1.5% Sarkosyl NL 97 + 0.1 mM oder 5 mM $MgCl_2$. Nach 30 Min. Schütteln bei Raumtemperatur wurde 1 Std. bei 100 000 g abzentrifugiert, der Sarkosyl-unlösliche Niederschlag zweimal in Wasser gewaschen, in 300 µl Probenpuffer

für die SDS-PAGE aufgenommen und der Überstand mit 95% (v/v) Aceton über Nacht gefällt. Nach mehrmaligem Waschen in Aceton wurde die Sarkosyl-lösliche Membranfraktion in 300 µl Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit der unlöslichen Membranfraktion einer SDS-PAGE unterzogen.

II.8.3 Trennung von innerer und äußerer Membran

Die nachfolgend beschriebene Methode entspricht im Wesentlichen einer Vorschrift von ITO et al. (64). Zellen aus 100 ml Kultur von UH 100/pTU 100 in LB/Tet-Medium wurden zweimal in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 gewaschen und in 10 ml Tris-Puffer + 20% Sucrose resuspendiert. Die Sphäroplastenbildung erfolgte für ca. 30 Min. in einem Eisbad: 100 µl einer Lysozym-Lösung (1 mg/ml in 0.1 M EDTA pH 7.3) wurden unter vorsichtigem Rühren zugegeben und die Bildung von Sphäroplasten unter dem Mikroskop verfolgt, bis sie vollständig war. Alle weiteren Schritte wurden dann bei 4°C durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden bei 20 000 g abzentrifugiert, in 6 ml 3 mM EDTA pH 7.3/20% Sucrose aufgenommen und mit Ultraschall zerbrochen (4 x 15 Sek. Beschallung mit je 15 Sek. Kühlpause). Anschließend wurden sie mit 6 ml 3 mM EDTA pH 7.3 verdünnt, die unvollständig zerkleinerten Zelltrümmer 10 Min. bei 2000 g abzentrifugiert und der Überstand in 2 ml Portionen auf einen Sucrose-Stufengradienten aufgetragen: 1.5 ml 70%; 7.5 ml 15% Sucrose in 3 mM EDTA pH 7.3. Die Zentrifugation erfolgte für 1.5 Std. bei 40 000 rpm in einem Beckman SW41 Rotor. Die Gesamtmembranfraktion, die auf das 70% Sucrosekissen aufgelaufen war, wurde abgesaugt, 1:1 mit 3 mM EDTA pH 7.3 verdünnt und je 2 ml auf einen zweiten Stufengradienten aufgetragen: 1.5 ml 70%; 7.5 ml 53% Sucrose in 3 mM EDTA pH 7.3. Nach 15 Std. Zentrifugation bei 30 000 rpm (SW41 Rotor) war die innere Membran auf das 53% Kissen, die äußere Membran auf das 70% Kissen aufgelaufen. Die Banden wurden abgesaugt, 1:3 mit 10 mM $MgCl_2$ verdünnt (bessere Ausbeute) und 2 Std. bei 200 000 g abzentrifugiert. Wurden die Membranen für die in vitro Proteinsynthese benötigt, sind sie in 500 µl 50 mM Triäthanol-

amin-HCl pH 7.5/5 mM Mg-Acetat/1 mM DTT resuspendiert worden.

II.8.4 Trypsinverdauung von ganzen Zellen

10 ml stationäre Zellen in LB/Tet-Medium wurden abzentrifugiert und in 6 ml 10 mM Tris-HCl pH 8.0 mit folgenden Zusätzen resuspendiert: 1.) + 5 mM EDTA; 2.) + 10 mM $MgCl_2$; 3.) keine Zusätze (Kontrolle). Nach Zugabe von 1 mg/ml Trypsin in 1.) und 2.) erfolgte die Trypsinverdauung für 6 Std. bei 37°C (Schüttler). Die Proteolyse wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 37°C mit 2 mg/ml Trypsin-Inhibitor abgebrochen, die Zellen zweimal mit Tris-Puffer + EDTA bzw. + $MgCl_2$ gewaschen und dann mit Ultraschall aufgebrochen (4 x 30 Sek. Beschallung mit je 30 Sek. Kühlpausen). Die Zellhüllen-Präparation mit anschließender SDS-PAGE erfolgte, wie in II.4.2 und II.4.5 beschrieben.

II.8.5 Pronaseverdauung von ganzen Zellen

10 ml stationäre Zellen in LB/Tet-Medium wurden abzentrifugiert und in 6 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit folgenden Zusätzen resuspendiert: 1.) + 5 mM EDTA; 2.) + 10 mM $MgCl_2$ und 3.) ohne Zusätze (Kontrolle). Nach Zugabe von 100 µg/ml Pronase in 1.) und 2.) wurde für 6 Std. bei 37°C inkubiert, dann abzentrifugiert und zweimal in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 5 mM EDTA bzw. mit 10 mM $MgCl_2$ gewaschen. Von diesen Pronase-behandelten Zellen wurden Zellhüllen präpariert (s.II.4.2) und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt.

II.9 Untersuchungen der Synthese des pro-OmpA Proteins bei 25°C

II.9.1 Puls-Versuch mit ^{35}S-Methionin

P 400-6 wurde bei 25°C bzw. bei 37°C in M9-Medium/0.4% Glucose/je 50 µg/ml Arginin, Leucin, Prolin und Threonin/ 5 µg/ml Vitamin B_1 bis zu 5 x 10^8 Zellen/ml angezogen*, abzentrifugiert und anschließend im gleichen Volumen mit Medium resuspendiert. Die Puls-Markierung erfolgte nach 2 Min.

---

*Die Generationszeit beträgt bei 37°C 70 Min. und 110 Min. bei 25°C.

Vorinkubation bei 25°C bzw. 37°C für 1 Min. mit 5 µCi ^{35}S-Methionin/ml (Amersham/Buchler; 1000 Ci/mmol). Der Puls wurde abgebrochen, indem man die Probe mit dem gleichen Volumen an zerstoßenem Eis mischte und mit Ultraschall behandelte (4 x 30 Sek. mit je 30 Sek. Kühlpause). Nach einer 1-stündigen Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Zellhüllen und ein entsprechendes Aliquot des Überstandes mit Antiserum gegen das OmpA Protein gefällt (s.II.4.3).

II.9.2 "Pulse-chase" Versuch mit ^{35}S-Methionin

P 400-6 wurde bei 25°C bzw. bei 37°C bis zu 5 x 10^8 Zellen/ml angezogen (s.II.9.1), abzentrifugiert und anschließend 10:1 mit frischem Medium konzentriert. Nach 2 Min. Vorinkubation bei 25°C bzw. 37°C wurde für 45 Sek. mit 5 µCi ^{35}S-Methionin (Amersham/Buchler; 1000 Ci/mmol)/ml markiert. Der "chase" (10, 45 und 255 Sek.) wurde mit L-Methionin (Endkonz. 20 mM) durchgeführt und mit zerstoßenem Eis gestoppt. Die Ultraschallbehandlung mit anschließender Immunfällung erfolgte, wie in II.9.1 beschrieben.

II.9.3 Zellhüllenpräparation mit Hilfe von Ultraschall oder der Frenchpress

Markierte Zellen von P 400-6 (s.II.9.1) wurden abzentrifugiert und in eiskaltem Tris-HCl pH 7.4 resuspendiert. 10^9 Zellen in 1 ml Tris-Puffer wurden 4 x 30 Sek. mit je 30 Sek. Kühlpausen im Eisbad beschallt bzw. 4 ml (5 x 10^{10} Zellen/ml) in einer Frenchpress bei 15 000 psi (2 Passagen bei 4°C) in der Anwesenheit von 5 µg Desoxyribonuklease aufgebrochen. Das Frenchpress-Lysat wurde 5 Min. bei 8000 g zentrifugiert und sowohl der Überstand als auch der Niederschlag in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 zu einer Endkonzentration resuspendiert, die 10^{10} Zellen/ml entsprach.

II.9.4 Isolierung von innerer und äußerer Membran aus dem Frenchpress-Lysat

Die Trennung der inneren und äußeren Membran erfolgte durch Sucrosegradienten-Zentrifugation des gesamten Frenchpress-Lysats (s.II.9.3) in einem Beckman SW60 Rotor: 1 ml Lysat

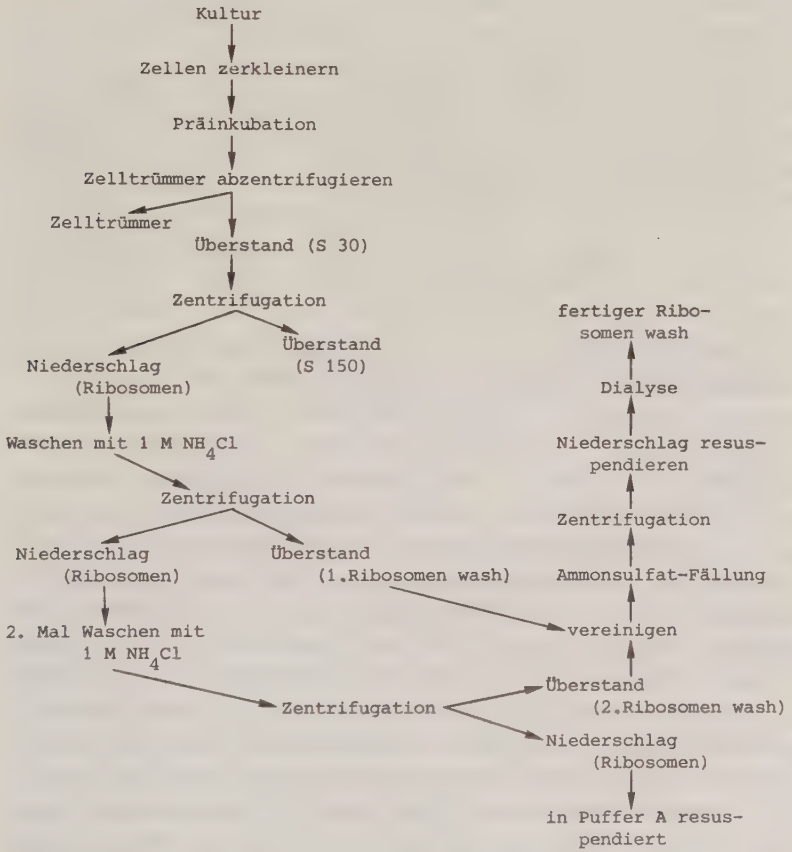
wurde auf Stufengradienten von 0.3 ml 60%; 1 ml 45% und 1.5 ml 20% Sucrose (w/w in 10 mM Tris-HCl pH 7.4) aufgetragen und anschließend 3 Std. bei 60 000 rpm und 4°C zentrifugiert. 21 Fraktionen (ca. 170 µl) wurden durch Anstechen der Röhrchen aufgefangen, entsprechend den sichtbaren Membranbanden vereinigt und nach Verdünnung, um die Sucrose-Konzentration auf 25% zu senken, immungefällt (s.II.4.3).

II.10 DNA-abhängige in vitro Proteinsynthese

II.10.1 Präparation eines zellfreien Translations-Transkriptions-Systems aus E. coli

500 ml Vorkultur von JC 3272 wurde über Nacht bei 28°C in TT-Medium angezogen. 5 l TT-Medium wurden mit dieser Vorkultur angeimpft und 4 Std. bei 28°C mit guter Durchlüftung inkubiert. Die Ausbeute betrug ca. 10 g Feuchtgewicht/l bei einer OD_{600} = 1.5. 50 g Feuchtgewicht wurden zweimal mit 500 ml Puffer A gewaschen, in 500 ml Puffer A resuspendiert und in einem Ribi Cell Fractionator (Sorvall) bei 4000-8000 psi zerkleinert (2 Passagen). Zelltrümmer wurden 1 Std. bei 48 000 g abzentrifugiert und der Überstand (ca. 80 ml) mit 50 ml Lösung B (s."Methoden") inkubiert, um die endogene mRNA abzubauen. Die Inkubation verlief für 1 Std. bei 37°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Das Gemisch wurde über Nacht in Puffer A dialysiert und dann 5 Std. bei 200 000 g zentrifugiert. Der Überstand (=S 150) wurde bei -80°C eingefroren; der Niederschlag hingegen über Nacht in 100 ml 1 M NH_4Cl in Puffer A gerührt, um die für die Proteinsynthese nötigen Proteinfaktoren von den Ribosomen abzuwaschen. Nach 5 Std. Zentrifugation bei 200 000 g wurde der Überstand (=1.Ribosomen wash) im Eisbad aufbewahrt, der Niederschlag ein zweites Mal mit 80 ml 1 M NH_4Cl in Puffer A über Nacht gerührt und anschließend die Ribosomen erneut bei 200 000 g für 5 Std. abzentrifugiert. Der Überstand (=2.Ribosomen wash) wurde mit dem 1.Ribosomen wash vereinigt, der Niederschlag in 2 ml Puffer A sorgfältig suspendiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Der vereinigte Ribosomen wash wurde mit Ammonsulfat (Endkonz. 70%) bei 4°C gefällt, 20 Min. bei

48 000 g abzentrifugiert und ebenfalls in 2 ml Puffer A suspendiert. Nachdem über Nacht gegen Puffer A dialysiert worden war, wurde das Dialysat bei -80°C eingefroren.



Aufarbeitungsschema des zellfreien Proteinsynthese-Systems

II.10.2 In vitro Proteinsynthese mit dem zellfreien System

Benötigt wurden folgende Komponenten:

1.) gereinigte Fraktionen aus der Präparation des Systems (S 150, Ribosomen, Ribosomen wash)

2.) L-Aminosäure-Stammlösung (2 mM je Aminosäure)

3.) Mg-Acetat-Stammlösungen verschiedener Konzentrationen, um die Mg-Konzentration des Synthese-Systems zu optimieren (zwischen 7 und 17 mM Endkonz.)
4.) ^{35}S-Methionin (Amersham/Buchler, 1000 Ci/mmol)
5.) Gemisch C (s."Methoden")
6.) Isolierte DNA in TE-Puffer (die DNA wurde in diesem Labor von Frau I. Haar isoliert [22])

Die relativen Mengen der einzelnen Komponenten wurden ermittelt, d.h. das System optimiert (maximaler Einbau von Radioaktivität in Trichloressigsäure-fällbares Material). Das Pipettierschema sah folgendermaßen aus:

DNA	S 150	Rib.	wash	Gem.C	Am. säuren	^{35}S-Met	0.1M $MgAc_2$	H_2O
o.4-1µg	12.5µl	1.25µl	1.25µl	12.5µl	0.25µl	50µCi/ml	5µl	ad 50µl Endvol.

Die Proteinsynthese erfolgte, indem man obige Komponenten in den angegebenen Mengen ansetzte und 1 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubierte. Anschließend wurden die Proben in ein Eisbad überführt, mit 50 µl doppelt konz. Probenpuffer für die SDS-PAGE versetzt, 5 Min. gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ein Aliquot von 10 µl wurde zuvor auf einen Whatman GF/C-Glasfilter pipettiert, für 5 Min. in eiskalte 10% Trichloressigsäure gelegt und dann auf einer Nutsche zuerst mit 10% Trichloressigsäure, dann mit Methanol gewaschen und in einem Szintillationszähler in 5 ml Omnifluor (Zinsser) gezählt. In einzelnen Versuchen waren während der Synthese noch andere Komponenten anwesend, wie z.B. Fraktionen der inneren und äußeren Membran von E. coli, 1% (v/v) Triton X-100 oder 170 µg/ml LPS (s."Ergebnisse"). In diesem Fall wurde entsprechend weniger Wasser in die Ansätze pipettiert, so daß das Endvolumen von 50 µl erhalten blieb. Sollte nach der Synthese der Ansatz noch mit Trypsin, Pronase(beide 100 µg/ml) oder 1% (v/v) Triton X-100 behandelt werden, dann wurde die radioaktive Synthese mit der 100-fachen Menge an unmarkiertem Methionin abgestoppt, die entsprechenden Substanzen in den 50 µl Ansatz pipettiert und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

III. E R G E B N I S S E

III.1 Charakterisierung des pro-OmpA Proteins in Minizellen

III.1.1 Immunfällung

Bestimmte Stämme von E. coli, wie z.B. χ 984, schnüren im Rahmen einer defekten Zellteilung an den Polen sog. Minizellen ab, das sind kleine runde Zellen ohne DNA. In diese Minizellen können Plasmide segregieren, während das bakterielle Chromosom in der Mutterzelle verbleibt. Folglich läuft in Minizellen eine nur noch plasmid-kodierte Proteinsynthese ab. Solche Zellen mit einem für die ß-Lactamase kodierenden Plasmid häufen deren Vorläufer an (2), während in normalen Zellen kein Vorläufer in nachweisbaren Mengen zu sehen ist. Es war also zu hoffen, daß Minizellen mit dem Plasmid pTU 100, das das OmpA Gen enthält (22,54), auch im Fall des OmpA Proteins den Vorläufer anhäufen.
Minizellen von χ 984, die das Plasmid pSC 101 bzw. sein Derivat pTU 100 enthielten, wurden mit ^{35}S-Methionin markiert, die Zellhüllen präpariert und anschließend einer Immunfällung mit Antiserum gegen das OmpA Protein unterzogen.
Abb.2B, Spalten 1,2 zeigt das Autoradiogram einer SDS-PAGE der Zellhüllen vor und nach der Immunfällung. Ein Polypeptid, das um ca. 2000 dalton größer ist als das OmpA Protein, präzipitierte zusammen mit dem OmpA Protein (dieses etwas größere Protein wird im Folgenden der Einfachheit halber als Vorläufer oder pro-OmpA Protein bezeichnet, obwohl der eigentliche Beweis für die Vorläufer-Hypothese erst in Kap. III.6 angetreten wird). Auch zwei kleinere Proteine mit ähnlicher Molekulargewichts-Differenz, wie bei dem OmpA Protein und seinem Vorläufer, fielen mit Antiserum aus. Auf diese beiden Polypeptide soll später noch ausführlich eingegangen werden (s.III.8). Wie aus Abb.2A, Spalte 5 ersichtlich ist, kann man den Vorläufer des OmpA Proteins bereits mit der Coomassie-Färbung erkennen. Er ist also in größeren Mengen in der Minizellmembran vorhanden.

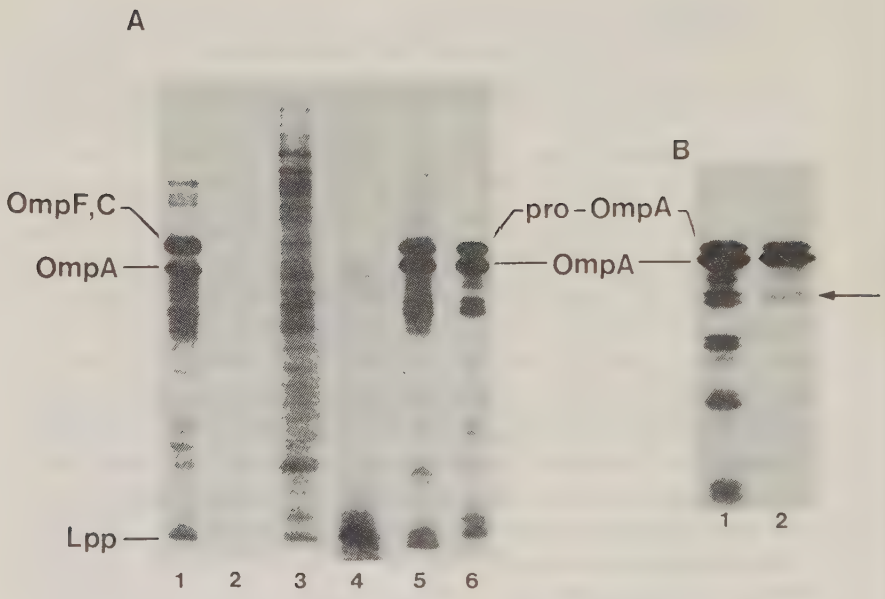


Abb.2 Markierung von Minizellen mit verschiedenen Plasmiden. Minizellen von χ 984 mit verschiedenen Plasmiden (s.u.) wurden mit ^{35}S-Methionin markiert und anschließend die Zellhüllen präpariert, wie in "Methoden" beschrieben. Die Zellhüllen wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt. A Zellhüllen aus Minizellen des Wildtyps χ 984; gefärbt (1) und Autoradiographie (2); Zellhüllen aus Minizellen von χ 984/pSC 101*; gefärbt (3) und Autoradiographie (4); Zellhüllen aus Minizellen von χ 984/pTU 100*; gefärbt (5) und Autoradiographie (6). B Autoradiographien der Zellhüllen von Minizellen aus χ 984/pTU 100 vor (1) und nach (2) der Immunfällung mit Anti-OmpA Serum. ⟶ die Satellitenproteine des OmpA Gens (s. dazu III.8).

---

* Minizellen mit Plasmiden fehlen chromosomal OmpA, OmpC und OmpF Protein.

III.1.2 Partielle Proteolyse

Um einen weiteren Hinweis für die Vermutung zu erhalten, daß es sich bei dem größeren Polypeptid um den Vorläufer des OmpA Proteins handelt, wurden Minizellen von χ 984/pTU 100 mit ^{35}S-Methionin markiert, einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend die entsprechenden Banden aus dem gefärbten Gel ausgeschnitten. Dann wurden die ausgeschnittenen Banden in einem zweiten Gel nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an V8-Protease aus Staphylococcus aureus bzw. Chymotrypsin während der Elektrophorese verdaut (30). Das Gel wurde der Autoradiographie unterworfen. Aus Abb.3A ist zu ersehen, daß beide Proteine nach V8-Protease Verdauung eine ganze Reihe von gemeinsamen Peptiden aufweisen. Mit zunehmenden Proteasekonzentrationen verschiebt sich das Fragmentmuster zu kleineren Peptiden hin, ohne daß die Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen abnimmt: gewisse Peptide verschwinden mit steigender Proteasekonzentration analog, um dafür kleineren Fragmenten Platz zu machen. Allerdings finden sich auch Peptide, die entweder nur bei dem einen oder nur bei dem anderen Protein vorkommen. An die Stelle von Peptiden, die nur bei dem OmpA Protein vorkommen, treten bei dem Vorläufer manchmal andere, etwas größere Peptide (mit Pfeilen gekennzeichnet). Die Differenz in den Molekulargewichten dieser Peptide entspricht in etwa der zwischen Vorläufer und OmpA Protein, so daß die größeren Peptide noch die Signalsequenz enthalten dürften.
Ein Abbau mit Chymotrypsin (Abb.3B) zeigt zwar nicht die ausgeprägte Abhängigkeit des Peptidmusters von der Proteasekonzentration wie bei der V8-Protease Verdauung, aber man sieht mehrere Peptide, die sowohl dem OmpA- als auch dem pro-OmpA Protein gemeinsam sind. Das Peptidmuster zeigt also auch hier eine klare Verwandtschaft zwischen OmpA Protein und seinem Vorläufer. Besonders auffallend ist das paarweise Vorkommen von Proteasefragmenten bei dem Vorläufer, wobei jeweils die obere Bande kein Äquivalent bei dem OmpA Protein findet, während die untere Bande jeweils in gleicher Höhe mit einem Peptid des OmpA Proteins wandert. Die Molekularge-

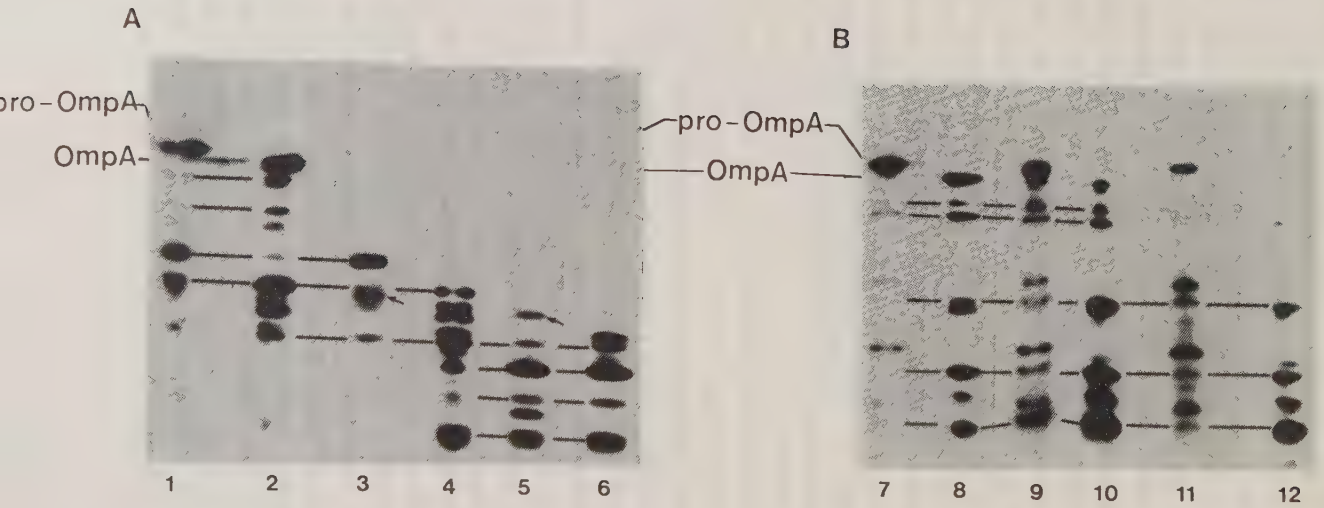


Abb.3 Partielle Proteolyse mit V8-Protease und Chymotrypsin (Autoradiographie). Markierte Banden des OmpA Proteins (Spalten 2,4,6 bzw. 8,10,12) und seines Vorläufers, des pro-OmpA Proteins (Spalten 1,3,5 bzw. 7,9,11) aus Minizellen von χ984/pTU 100 wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel herausgeschnitten und während einer zweiten SDS-PAGE mit V8-Protease (A) oder mit Chymotrypsin (B) gespalten. Eine Autoradiographie schloß sich an. Protease-Konzentrationen in A: 0.2 µg (1,2), 2 µg (3,4) und 6 µg V8-Protease/Bande (5,6). Konzentrationen in B: 1 µg (7,8), 10 µg (9,10) und 20 µg Chymotrypsin/Bande (11,12). Pfeile: s. Text.

wichtsdifferenz bei den einzelnen Bandenpaaren ist etwa gleich groß, wie die zwischen Vorläufer und OmpA Protein, was wieder zu der Vermutung führt, daß die größeren Peptide des Vorläufers noch die Signalsequenz enthalten.

III.1.3 Hitzemodifizierbarkeit

Das OmpA Protein zeigt bezüglich seines Lösungsverhaltens in SDS-Lösungen eine Besonderheit: bei Temperaturen bis zu 50°C gelöst, läuft es in SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Molekulargewicht von 28 000, während es bei 100°C gelöst als ein Protein von 33 000 dalton wandert (114). Dieses Phänomen wird als Hitzemodifizierbarkeit bezeichnet und sollte neben den bereits geschilderten Versuchen dazu dienen, die Verwandtschaft des Vorläufers mit dem OmpA Protein zu demonstrieren.
Minizellen von χ984/pTU 100 wurden mit ^{35}S-Methionin markiert und in Probenpuffer für die SDS-PAGE entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für 5 Min. bei 100°C gelöst und anschließend die unterschiedlich gelösten Proben mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Überraschenderweise zeigt das pro-OmpA Protein unabhängig von der Lösungstemperatur dasselbe elektrophoretische Verhalten, während das OmpA Protein, wie erwartet, bei Raumtemperatur gelöst ein scheinbar niedrigeres Molekulargewicht aufweist (Abb.4). Die Hitzemodifizierbarkeit kann also nicht dazu benutzt werden, die Verwandtschaft zwischen OmpA Protein und seinem Vorläufer zu demonstrieren. Das Fehlen einer Hitzemodifizierbarkeit bei dem pro-OmpA Protein ist aber deswegen äußerst interessant, weil es zeigt, daß der Vorläufer in einer anderen Konformation wie das OmpA Protein vorliegen muß. Gerade die Konformation des OmpA Proteins führt nämlich dazu, daß es bei niedrigen Lösungstemperaturen durch SDS nicht vollständig denaturiert werden kann, während es bei 100°C gelöst als nahezu völlig entfaltetes Molekül vorliegt (z.B.28).

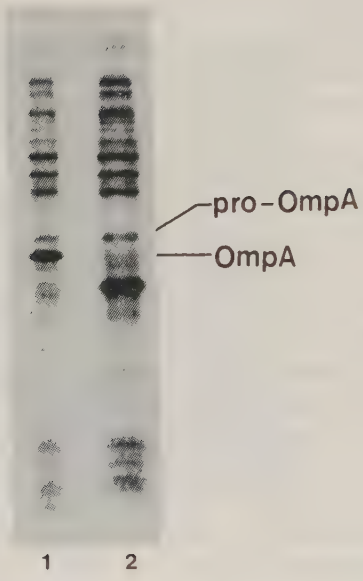


Abb.4 Der Vorläufer aus Minizellen bei verschiedenen Lösungstemperaturen (Coomassie-Färbung). Minizellen von χ984/pTU 100 wurden in Probenpuffer für die SDS-PAGE gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Minizellen bei 100°C für 5 Min. gelöst (1); Minizellen über Nacht bei Raumtemperatur gelöst (2).

III.2 Versuche zur Anreicherung in vivo von pro-OmpA Protein

III.2.1 Markierung in Anwesenheit von Proteolyse-Inhibitoren

Verschiedene Autoren konnten zeigen bzw. vermuteten, daß die Signalabspaltung bei bestimmten Vorläuferproteinen aus der äußeren Membran von E. coli durch Anästhetika wie Procain oder durch Trypsin-Inhibitoren wie Tosyl-lysyl-chloromethylketon (TLCK) und p-Aminobenzamidin (PAB) gehemmt wird (44, 62,76). Es wurde versucht, mit Hilfe dieser Proteolyse-Inhibitoren das pro-OmpA Protein in Minizellen von χ984/pTU 100 anzureichern.

Die Minizellen wurden mit ^{35}S-Methionin in Anwesenheit von 100 mM Procain, 1 mg/ml TLCK oder 25 mM PAB markiert, die ganzen Zellen in Probenpuffer für die SDS-PAGE gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abb.5 zeigt eine Autoradiographie, aus der zu ersehen ist, daß mit keiner der verwendeten Substanzen eine merkliche Akkumulation an Vorläufer relativ zu dem OmpA Protein erfolgt.

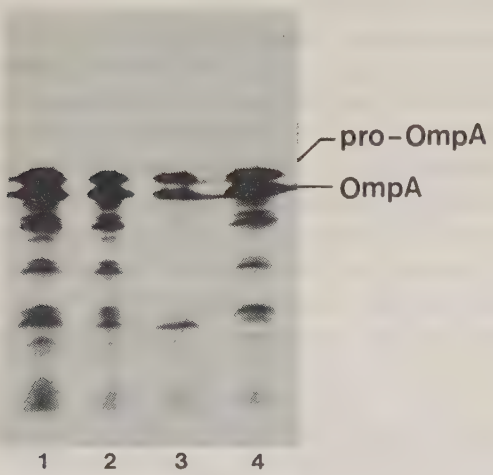


Abb.5 Markierung von Minizellen in Anwesenheit von Proteolyse-Inhibitoren (Autoradiographie). Minizellen von χ 984/pTU 100 wurden mit ^{35}S-Methionin in Anwesenheit von Procain, TLCK oder PAB markiert, in Probenpuffer für die SDS-PAGE bei 100°C gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Markierung in Anwesenheit von 1 mg/ml TLCK (1); 25 mM PAB (2); 100 mM Procain (3); Kontrolle ohne Inhibitoren (4).

Ein Vergleich der eingebauten Radioaktivität zeigte, daß der Einbau mit TLCK und PAB dem der unbehandelten Kontrolle entsprach, während in Anwesenheit von Procain deutlich weniger Radioaktivität in die Minizellen inkorporiert wurde (ca.30% der Kontrolle). Banden, die schon in der Kontrolle nur schwach markiert waren, sind aus diesem Grund in Anwesenheit

von Procain nicht mehr oder nur noch schwach zu erkennen (Abb.5, Spalte 3). Procain scheint also in Minizellen keinen spezifischen Effekt auf die Abspaltung der Signalsequenz zu haben.

III.2.2 Test auf Phagenempfindlichkeit in Anwesenheit von Procain

Um eventuell eine Anreicherung des Vorläufers in normalen Zellen von E. coli zu erreichen, wurde P 400 in LB-Medium mit und ohne Procain (200 mM) über Nacht angezogen und auf LB-Platten mit und ohne Procain (200 mM) ausgestrichen. Verschiedene Konzentrationen des Phagen Tu II* (Rezeptor: OmpA Protein; Ref.5,32) wurden auf den Ausstrich getropft und nach ca. 8 Std. Inkubation bei 37°C ausgewertet, bei welchen Phagenkonzentrationen die Zellen lysierten. Tab.4 zeigt die Ergebnisse:

Platten	+ Procain				- Procain			
Phagen/ml / Anzucht	$4x10^9$	$4x10^8$	$4x10^7$	$4x10^4$	$4x10^9$	$4x10^8$	$4x10^7$	$4x10^4$
+ Procain	S	S	R	R	S	S	S	± S
- Procain	S	S	S	R	S	S	S	S

Tab.4 Test auf Phagenempfindlichkeit gegen Tu II* in Abhängigkeit von Procain und der Phagenkonzentration. S = sensitiv; R = resistent.

Zieht man die Zellen mit Procain an und macht man auch den Phagentest in Anwesenheit von Procain, dann sind die Zellen bis zu einer Konzentration von 4×10^7 Phagen/ml resistent. Anzucht ohne Procain und Phagentest mit Procain macht die Zellen sensitiver gegen den Phagen, während bei dem Phagentest in Abwesenheit von Procain die Zellen bis zu einer Konzentration von 4×10^4 Phagen/ml sensitiv bleiben, unabhängig davon, ob sie mit oder ohne Procain vorgezogen wurden. Zellen

von P 400 werden also in Anwesenheit von 200 mM Procain verglichen mit unbehandelten Zellen gegen den Phagen Tu II* resistent, vorausgesetzt sie sind mehrere Generationen in Procain vorgewachsen. Umgekehrt verschwindet die Resistenz nach einigen Generationen Wachstum in Procain-freiem Medium.

III.2.3 Zellhüllen nach Procain-Behandlung

200 mM Procain verleiht den Zellen eine gewisse Resistenz gegen den Phagen Tu II*. Die Frage war, ob Procain in dieser Konzentration vielleicht die Bildung des OmpA Proteins hemmt und stattdessen eine Anhäufung des Vorläufers verursacht, der für den Phagen nicht zugänglich ist.
Zellen von P 400 wurden in LB-Medium mit 200 mM Procain über Nacht angezogen, mit Ultraschall aufgebrochen und nach der Zentrifugation sowohl die Zellhüllen als auch der Aceton-gefällte Überstand auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es konnte aber weder in den Zellhüllen noch im Überstand pro-OmpA Protein in färbbaren Mengen gefunden werden, so daß auf eine Dokumentation der Ergebnisse verzichtet wird.

III.2.4 Sphäroplastenpräparation

Sphäroplasten fehlt eine intakte äußere Membran. Da bislang noch nicht bekannt ist, ob die Abspaltung der Signalsequenz in der inneren oder der äußeren Membran bzw. im Periplasma abläuft, wurde in Betracht gezogen, daß in Sphäroplasten die Signalabspaltung wegen der defekten äußeren Membran nicht stattfinden kann und daß sich stattdessen der Vorläufer des OmpA Proteins anhäuft. Zellen von UH 100/pTU 100 (in LB/Tet-Medium angezogen) wurden deshalb sphäroplastiert und ihre Zellhüllen präpariert. Eine SDS-PAGE zeigte aber, daß es zu keiner Akkumulation von Vorläufer kommt (Daten nicht gezeigt).

III.2.5 Detergens-Extraktion von Zellhüllen aus Minizellen

FILIP et al. (41) konnten zeigen, daß die innere Membran von E. coli durch das Detergens Sarkosyl gelöst wird, während die äußere Membran unberührt bleibt. Dasselbe Verhalten wurde bei der Extraktion mit Triton X-100 beobachtet (97,111). Ist der

Vorläufer des OmpA Proteins in Minizellen (noch) nicht ordnungsgemäß in die äußere Membran integriert, dann hätte er Detergens-löslich sein können, während das OmpA Protein als Bestandteil der äußeren Membran nicht durch Sarkosyl bzw. Triton X-100 gelöst werden sollte. Auf diese Weise wäre es möglich gewesen, Vorläufer von reifem Protein zu trennen und zu isolieren.
Die Zellhüllen von Minizellen aus χ 984/pTU 100 wurden präpariert und anschließend mit Sarkosyl bzw. Triton X-100 extrahiert. Da Mg^{2+} einen großen Einfluß auf die Stabilität der äußeren Membran hat, wurde die Extraktion ohne Mg^{2+} oder in Anwesenheit verschiedener Mg^{2+}-Konzentrationen durchgeführt. Nach der Extraktion wurde zentrifugiert und sowohl der Detergens-lösliche Überstand (nach Acetonfällung) als auch die unlöslichen Zellhüllenbestandteile einer SDS-PAGE unterzogen. Überraschenderweise ist sowohl der Vorläufer als auch das OmpA Protein selbst größtenteils in Sarkosyl löslich (s.auch III.4.2) und zwar unabhängig von der Mg^{2+}-Konzentration (Abb.6). Bei der Triton-Extraktion ist das pro-OmpA Protein und das reife Produkt weitgehend unlöslich. Nur in der Abwesenheit von Mg^{2+} werden ca. 10% des OmpA Proteins von Triton X-100 gelöst(Abb.7; Spalten 2,3). In Anwesenheit von 0.1 mM Mg^{2+} sind dann nur noch ganz geringe Mengen an OmpA Protein löslich (Spalten 4,5) und bei 5 mM Mg^{2+} ist das gesamte Protein Triton-unlöslich (Spalten 6,7). Mit zunehmender Stabilisierung der äußeren Membran durch steigende Mg^{2+}-Konzentrationen wird also das OmpA Protein schließlich vollkommen Triton-unlöslich.
In allen Fällen wurde kein Vorläufer im Triton-löslichen Überstand gefunden. Für eine Trennung von pro-OmpA Protein und reifem Produkt ist also weder die Sarkosyl- noch die Triton-Extraktion geeignet.

III.3 Isolierung des pro-OmpA Proteins

III.3.1 Säulenchromatographische Methoden

Minizellen von χ 984/pTU 100 wurden in Puffer bei Raumtemperatur gelöst und auf Sephacryl S-200 Superfine (unmarkierte

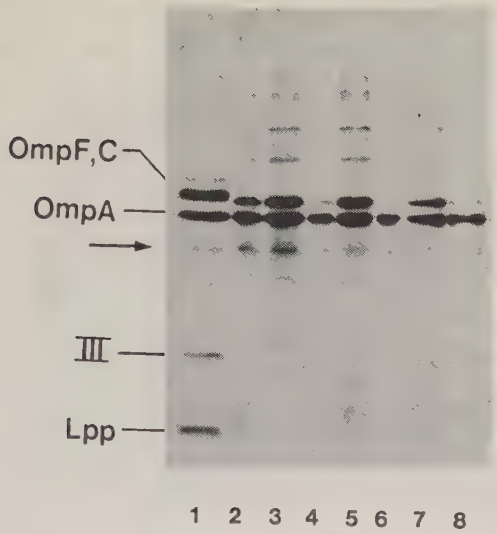


Abb.6 Sarkosyl-Extraktion von Minizellen (Coomassie-Färbung). Von Minizellen aus χ984/pTU 100 wurden Zellhüllen präpariert und mit Sarkosyl, wie in "Methoden" beschrieben, in Anwesenheit von verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen extrahiert. Sowohl der Sarkosyl-lösliche Überstand (nach Aceton-Fällung) als auch der Sarkosyl-unlösliche Rückstand der Zellhüllen wurde einer SDS-PAGE unterzogen. Äußerer Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (1); unbehandelte Zellhüllen von Minizellen aus χ984/pTU 100 (2); Sarkosyl-Extraktion ohne $MgCl_2$ (3/sl, 4/su); + 0.1 mM $MgCl_2$ (5/sl, 6/su); + 5 mM $MgCl_2$ (7/sl, 8/su). sl = Sarkosyl-löslich, su = Sarkosyl-unlöslich. Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Für die mit ⟶ bezeichnete Bande s.III.8. Lpp=Lipoprotein

Zellen) bzw. Ultrogel AcA 54 (markierte Zellen) säulenchromatographisch getrennt. Sephacryl S-200 Superfine ist ein mit Bisacrylamid quervernetztes Dextranderivat; Ultrogel AcA 54 ein Gemisch aus 5% Polyacrylamid-Kügelchen und 4% Agarose mit einem Fraktionierbereich von 5000-70 000 dalton (für globu-

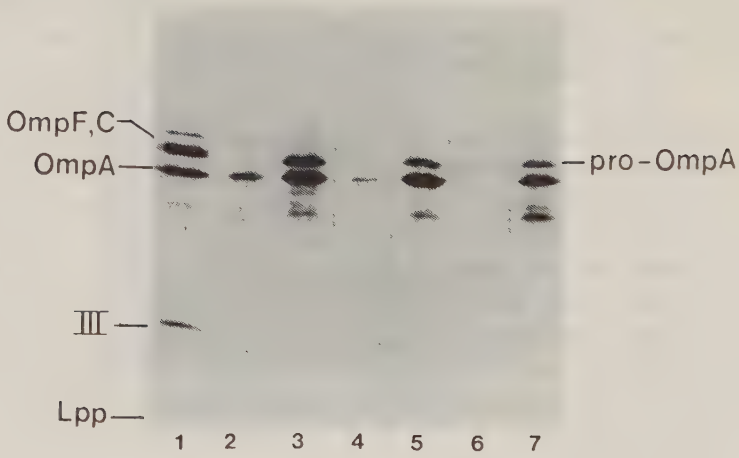


Abb.7 Triton X-100 Extraktion von Minizellen (Coomassie-Färbung). Zellhüllen von Minizellen aus χ 984/pTU 100 wurden, wie in "Methoden" beschrieben, in Anwesenheit von verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen mit Triton X-100 extrahiert und sowohl der Triton-lösliche Überstand als auch der unlösliche Niederschlag der Zellhüllen mittels der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (1); Extraktion ohne $MgCl_2$ (2/Tl, 3/Tu); + 0.1 mM $MgCl_2$ (4/Tl, 5/Tu); + 5 mM $MgCl_2$ (6/Tl, 7/Tu). Tu = Triton-löslich, Tu = Triton-unlöslich. Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Lpp = Lipoprotein.

läre Proteine). Die Minizellen wurden deshalb bei Raumtemperatur gelöst, weil das OmpA Protein im Vergleich zu seinem Vorläufer bei der SDS-PAGE mit einer scheinbaren Molekulargewichts-Differenz von 7000 dalton läuft, wenn es bei Temperaturen bis zu 50°C gelöst wird (s.III.1.3 und Diskussion). Deswegen wurde vermutet, daß die Proteine auch bei der Säulenchromatographie in Gelen auf Acrylamid-Basis dasselbe Verhal-

ten zeigen. Die Molekularsieb-Trennung wäre dann aufgrund der (scheinbar) größeren Molekulargewichts-Differenz eher möglich gewesen. Wie aber eine Analyse der einzelnen Fraktionen des Säuleneluates auf einem SDS-Polyacrylamidgel zeigte, konnte der Vorläufer nicht von dem reifen Protein getrennt werden. Auf eine Dokumentation der Ergebnisse wird daher verzichtet.

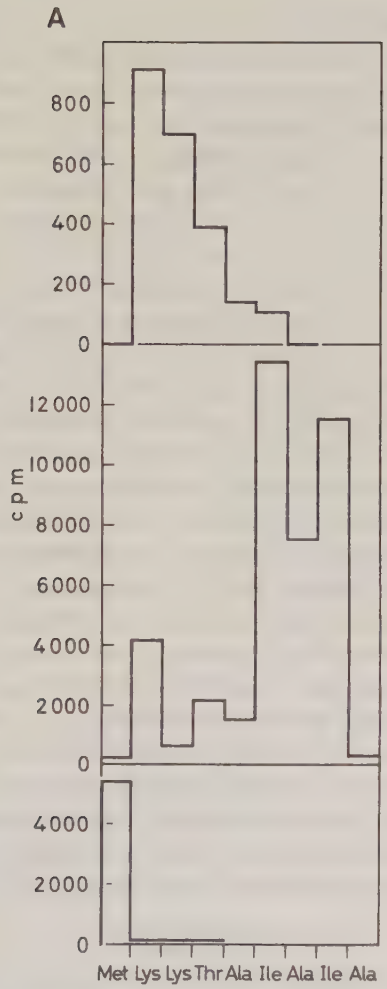
III.3.2 Proteinelution aus dem SDS-Polyacrylamidgel und Teilsequenzierung des pro-OmpA Proteins

Drei Ansätze von 2 x 10^{10} Minizellen aus χ984/pTU 100 wurden mit ^{35}S-Methionin, ^{3}H-Isoleucin bzw. ^{14}C-Lysin markiert, wobei der Einbau ca. 9%, 6% bzw. 1% der eingesetzten Radioaktivität betrug. Anschließend wurden die radioaktiven Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden des pro-OmpA Proteins aus den Gelstückchen elektro-eluiert. Die Elution ist nahezu quantitativ (98% der in Form der Gelstückchen eingesetzten Radioaktivität wird eluiert), und der eluierte Vorläufer ist frei von Verunreinigungen, wie die Autoradiographie einer SDS-PAGE bewies (Abb.8).

Abb.8 SDS-PAGE des elektro-eluierten Vorläufers aus Minizellen (Autoradiographie). Die Bande links unterhalb der pro-OmpA Bande rührt von einer zu stark markierten Kontrollprobe in der Spalte links daneben her und ist dem OmpA Protein dieser Kontrollprobe zuzuschreiben.

Der eluierte Vorläufer wurde mit unmarkiertem OmpA Protein versetzt (s."Methoden") und nach EDMAN (36) von Hand sequenziert. Unmarkiertes PTH-Methionin, -Isoleucin und -Lysin wurde nach jedem Abbauschritt entsprechend den radioaktiven Aminosäuren dazugegeben und mittels der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Flecken der PTH-Aminosäuren aus den einzelnen Abbauschritten wurden aus dem Chromatogram gekratzt und die Radioaktivität gezählt. Die Ergebnisse sieht man in Fig.1. Entsprechend der aus DNA-Sequenzdaten vorhersagbaren Signalsequenz des OmpA Proteins (14,83) findet man in Position -21 Methionin, in Position -20 und -19 Lysin und in Position -16 und -14 Isoleucin. Ein Lysin-Rest in Position -18 kann anhand dieser Daten nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, ist aber durch die DNA-Sequenz des Signalpeptides widerlegt. Wie man sieht, ist aufgrund des schlechten Einbaus von ^{14}C-Lysin in die Minizellen die in Form von PTH-^{14}C-Lysin freigesetzte Radioaktivität nur ca. 10% der, die bei den anderen Aminosäuren freigesetzt wurde. Angesichts der sehr guten Übereinstimmung mit den DNA-Daten wurde auf eine quantitative Analyse der Radioaktivitäts-Ausbeute pro markiertem Aminosäurerest wegen zu vieler Unsicherheitsfaktoren verzichtet (z.B. Grad der Löslichkeit der verschiedenen PTH-Aminosäuren aus dem Kieselgel des Dünnschichtchromatograms, unterschiedliche Verluste während und nach der Chromatographie bzw. bei den einzelnen EDMAN-Abbauschritten, unterschiedliche Zählausbeuten der markierten PTH-Aminosäuren usw.).

Bei der Synthese eines prokaryontischen Proteins ist die erste Aminosäure ein Methionin, dessen Aminogruppe formyliert ist. Ist die NH_2-Gruppe des endständigen Methionins durch einen Formylrest blockiert, dann kann das Phenylthiocyanat nicht an die NH_2-Gruppe angelagert werden, d.h. eine Sequenzierung nach EDMAN kann aufgrund des blockierten Methionin-Restes nicht eingeleitet werden. Die Tatsache, daß die EDMAN-Sequenzierung des Vorläufers erfolgreich durchgeführt werden konnte, obwohl der Formylrest des endständigen Methionins vorher nicht abgespalten wurde, zeigt, daß das pro-OmpA Protein in Minizellen bereits in der deformylierten Form vorliegt.



B

```
ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG
Met-Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Ala-
-21                      -15

ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT
Ile-Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Gly-
                -10
                           ↓
TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC
Phe-Ala-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-
        -5               -1

GCT CCG AAA....
Ala-Pro-Lys....
+1
```

Fig.1

Proteinchemische Evidenz für die Signalsequenz des pro-OmpA Proteins. A In Form der PTH-Aminosäuren freigestzte Radioaktivität aus dem pro-OmpA Protein. Unterer Teil: markiert mit ^{35}S-Methionin, mittlerer Teil: markiert mit ^{3}H-Isoleucin, oberer Teil: markiert mit ^{14}C-Lysin. Die ersten neun Aminosäuren der Signalsequenz sind unten angegeben und entsprechen den einzelnen EDMAN-Abbauschritten. B Die aufgrund der DNA-Sequenz abgeleitete Signalsequenz des pro-OmpA Proteins zusammen mit dem kodogenen DNA-Strang. Aminosäurereste des Signalpeptids sind mit negativem Vorzeichen numeriert, die des reifen Proteins mit positivem Vorzeichen. Der Pfeil zeigt die Spaltstelle der postulierten Signalpeptidase an.

III.4 Charakterisierung der Plasmidmutante pTU 105

Während der Studien zum OmpA Protein aus Minizellen wurde die Plasmidmutante pTU 105 isoliert. Sie ist resistent gegen den Phagen Tu II* (5,32), aber sensitiv gegenüber seiner Wirtsbereichsmutante K3h1, die nur sehr geringe Mengen an OmpA Protein als Rezeptor benötigt (78). Als Folge der Mutation werden in diesem Fall jedoch dem Wildtyp entsprechende Mengen eines Proteins synthetisiert, das sich in der Zellhülle befindet und das elektrophoretisch ganz ähnlich dem pro-OmpA Protein wandert (s.z.B.Abb.9). Der Verdacht lag nahe, daß es sich um eine Mutante handelt, bei der die Signalsequenz nicht entfernt wird: der Vorläufer könnte größtenteils in der inneren Membran bleiben und wäre folglich für den Phagen Tu II* nicht mehr zugänglich. Hätte dies zugetroffen, dann wäre UH 100/pTU 105 eine reiche Quelle für einen solchen (defekten?) Vorläufer gewesen. Deshalb wurde das Protein dieser Mutante detaillierter untersucht. Wenngleich sich später herausstellte, daß die genannte Vermutung unzutreffend war[+)], konnten die Experimente mit UH 100/pTU 105 wichtige Daten zur Assoziation des normalen OmpA Proteins mit der äußeren Membran liefern. Da also der Verdacht bestand, daß das fragliche Protein der Mutante UH 100/pTU 105 den Vorläufer des OmpA Proteins darstellt, wurde zunächst versucht, den mutmaßlichen Vorläufer zu lokalisieren. Es wurde aufgrund der Resistenz gegen den Phagen Tu II* vermutet, daß das Mutantenprotein größtenteils nicht in der äußeren Membran sitzt bzw. von außen nicht zugänglich ist. Auch wird von allen zur Zeit diskutierten Mo-

---

[+)] In Minizellen mit dem Plasmid der Mutante wird neben dem fraglichen Protein ein (Mutanten-)Vorläufer synthetisiert (s.Abb.23) und bei der in vitro Proteinsynthese kodiert das Plasmid der Mutante für einen größeren Vorläufer wie das Wildtyp-Plasmid (s.Abb.18). Das Mutanten-Protein stellt also nicht den Vorläufer des OmpA Proteins dar, sondern ist auf eine Mutation im Strukturgen zurückzuführen. Diese Mutation verleiht dem pTU 105-Protein die abweichende elektrophoretische Beweglichkeit.

dellen zur Sekretion von Proteinen postuliert, daß die Abspaltung der Signalsequenz schon vor der Einlagerung des Proteins in die äußere Membran erfolgt. Ein Vorläufer in der äußeren Membran war also unwahrscheinlich. Aus den genannten Gründen wurde deshalb untersucht, ob sich das pTU 105-Protein vielleicht im Periplasma oder in der inneren Membran befindet.

III.4.1 Osmotischer Schock

Zellen von UH 100 mit dem Plasmid pTU 100 und der Mutante UH 100/pTU 105 wurden nach NEU & CHOU (89) osmotisch geschockt. Der Versuch sollte zeigen, ob sich der mutmaßliche Vorläufer der Mutante im Periplasma oder der Membranfraktion befindet. Von den osmotisch geschockten Zellen wurden die Zellhüllen präpariert, während der Überstand aus der Schockbehandlung mit Trichloressigsäure gefällt und, zusammen mit den Zellhüllen der geschockten Zellen einer SDS-PAGE unterzogen wurde (Abb.9). Während die Zellhüllenfraktionen das Wildtyp-OmpA Protein bzw. das pTU 105-Protein enthalten (Spalten 1, 2), ist das Proteinmuster der osmotischen Schockflüssigkeit in beiden Fällen absolut identisch (Spalten 3, 4). Das pTU 105-Protein muß sich also in der inneren oder der äußeren Membran befinden. Man beachte eine Bande aus der Schockflüssigkeit, die etwa in Höhe des pro-OmpA Proteins liegt. Sie hat jedoch nichts mit dem OmpA Protein zu tun, sondern stellt wohl ein periplasmatisches Protein dar. Wäre es der Vorläufer, dann sollte dieser bei der Mutante im gleichen Maße langsamer laufen wie das pTU 105-Protein (s. dazu Fußnote S.48).

III.4.2 Sarkosyl-Extraktion

Als Vorläufer des OmpA Proteins hätte das pTU 105-Protein sich in der inneren Membran befinden können. Deshalb wurden die Zellhüllen mit dem ionischen Detergens Sarkosyl extrahiert, denn es löst selektiv die innere Membran, während die äußere Membran unberührt bleibt (29,41). Sarkosyl-Löslichkeit des pTU 105-Proteins wäre also ein Hinweis für seine Lokalisation in der inneren Membran gewesen.
Von dem Wildtyp UH 100/pTU 100 und der Mutante UH 100/pTU 105 wurden Zellhüllen präpariert und für 30 Min. bei Raumtemperatur

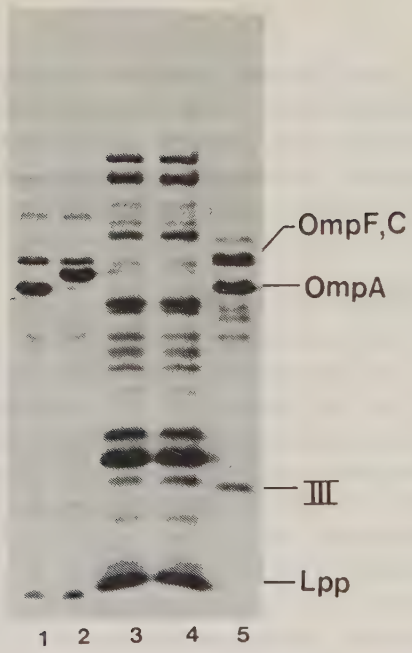


Abb.9 Osmotischer Schock (Coomassie-Färbung). Zellen von UH 100/pTU 100 und der Plasmidmutante UH 100/pTU 105 wurden osmotisch geschockt und anschließend sowohl die osmotische Schockflüssigkeit (nach Aceton-Fällung) als auch die geschockten Zellen (nach Präparation der Zellhüllen) auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hüllen der geschockten Zellen des Wildtyps UH 100/pTU 100 (1) bzw. der Mutante UH 100/pTU 105 (2); osmotische Schockflüssigkeit von Wildtyp (3) bzw. Mutante (4); äußerer Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (5). Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Lpp = Lipoprotein.

mit Sarkosyl in Anwesenheit von verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen geschüttelt (Mg^{2+} hat einen großen Einfluß auf die Stabilität der äußeren Membran). Anschließend wurden die Sarkosyl-unlöslichen Zellhüllen abzentrifugiert, während der Sarkosyl-lösliche Teil der Membranen mit Aceton gefällt wurde. Beide Membranfraktionen, Sarkosyl-lösliche wie -unlösliche, wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Abb.10 zeigt das Ergebnis:

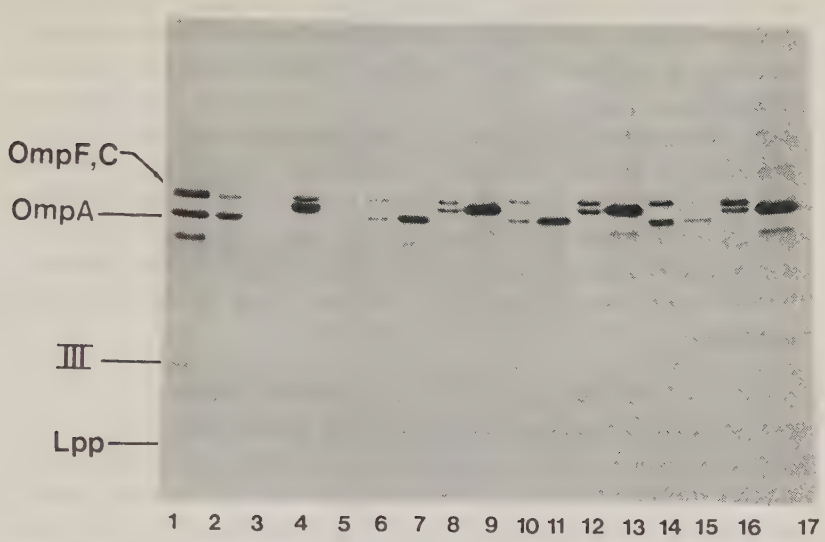


Abb.10 Sarkosyl-Extraktion von normalen Zellen (Coomassie-Färbung). Zellhüllen von UH 100/pTU 100 und der Plasmidmutante UH 1oo/pTU 105 wurden mit Sarkosyl extrahiert und anschließend sowohl der Sarkosyl-lösliche Überstand (nach Acetonfällung) als auch der Sarkosyl-unlösliche Zellhüllenrückstand einer SDS-PAGE unterzogen. Äußerer Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (1); Kontrolle ohne Sarkosyl-Behandlung von Wildtyp (2/Niederschlag, 3/Überstand) bzw. Mutante (4/Niederschlag, 5/Überstand); Sarkosyl-Extraktion ohne $MgCl_2$ von Wildtyp (6/Su, 7/Sl) bzw. Mutante (8/Su, 9/Sl); + 0.1 mM $MgCl_2$ bei Wildtyp (10/Su, 11/Sl) bzw. Mutante (12/Su, 13/Sl); + 5 mM $MgCl_2$ bei Wildtyp (14/Su, 15/Sl) bzw. Mutante (16/Su, 17/Sl). Su = Sarkosyl-unlöslich, Sl = Sarkosyl-löslich. Die Mutante UH 100/pTU 105 enthielt in diesem Fall zusätzlich eine chromosomale Mutation im ompB-Locus, die zum Verlust des OmpC Proteins führt. Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Lpp = Lipoprotein.

In Abwesenheit von Mg^{2+} oder bei der niedrigen Mg^{2+}-Konzentration (0.1 mM) verhalten sich Wildtyp- und Mutanten-Protein gleich; in beiden Fällen ist das fragliche Protein zu 80-90% in Sarkosyl löslich (Spalten 7, 11 bzw. 9, 13). In Anwesenheit von 5 mM Mg^{2+} jedoch wird das Wildtyp-OmpA Protein größtenteils unlöslich in Sarkosyl (Spalte 14), während sich bei der Mutante UH 100/pTU 105 verglichen mit den anderen Proben kein Unterschied zeigt (Spalte 16). Eine mögliche Erklärung, warum das Wildtyp-OmpA Protein als Bestandteil der äußeren Membran trotzdem Sarkosyl-löslich ist, wird in der Diskussion geliefert.

III.4.3 Trennung von innerer und äußerer Membran

Die Sarkosyl-Extraktion konnte nicht klären, ob sich das pTU 105-Protein in der inneren oder der äußeren Membran befindet, denn auch das Wildtyp-OmpA Protein ließ sich unter bestimmten Bedingungen mit Sarkosyl extrahieren (Erklärung hierfür s. Diskussion). Deshalb wurde eine Trenung von innerer und äußerer Membran nach ITO et al. (64) durchgeführt, um das pTU 105-Protein zu lokalisieren.
Sphäroplasten des Wildtyps UH 100/pTU 100 und der Mutante UH 100/pTU 105 wurden mit Ultraschall aufgebrochen, die Gesamtmembranen auf einem Sucrose-Stufengradienten isoliert und auf einem zweiten Sucrosegradienten aufgetrennt. In Abb.11 ist eine SDS-PAGE der beiden Membranbanden zu sehen. Der größte Teil des Wildtyp-OmpA Proteins und auch des pTU 105-Proteins befindet sich in der äußeren Membran (Spalten 3, 5), wenn auch ein nicht unbeträchtlicher Anteil der beiden Proteine, wohl aufgrund unzureichender Membrantrennung, mit der inneren Membran sedimentiert (Spalten 2,4). Ein Protein in der Höhe des pro-OmpA Proteins sedimentiert bei dem Wildtyp mit der inneren Membran (Spalte 2). Es stellt höchstwahrscheinlich ein periplasmatisches Protein dar (s. osmotische Schockversuche) und wird bei der Mutante von dem pTU 105-Protein überlagert.

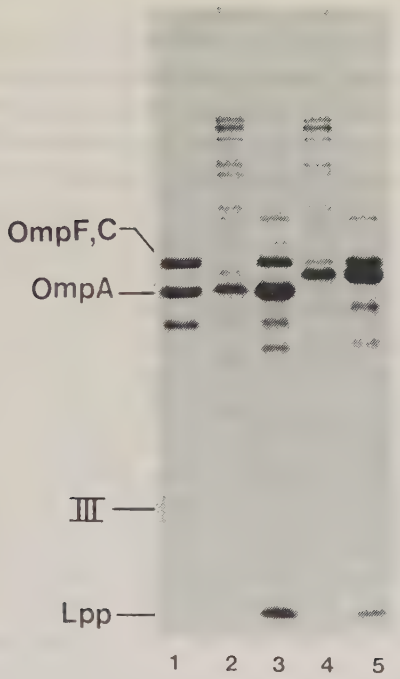


Abb.11 Isolierung der inneren und äußeren Membran (Coomassie-Färbung). Aus Zellen von UH 100/pTU 100 und der Plasmidmutante UH 100/pTU 105 wurden nach ITO et al. (64) über zwei Sucrose-Stufengradienten die innere und die äußere Membran isoliert und beide einer SDS-PAGE unterzogen. Äußerer Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (1); innere (2) bzw. äußere (3) Membran des Wildtyps UH 100/pTU 100; innere (4) bzw. äußere (5) Membran der Mutante UH 100/pTU 105. Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Lpp = Lipoprotein.

III.4.4 Trypsin- und Pronaseverdauung ganzer Zellen

Im Laufe der Versuche zu dem pTU 105-Protein konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem fraglichen Protein nicht um den Vorläufer, sondern um ein mutiertes OmpA Protein handelt (s. Fußnote, S.48) und daß es sich, jedenfalls größtenteils, in der äußeren Membran befinden muß. Bei der Sarkosyl-Extraktion verhält sich das Mutanten-Protein aber anders als das OmpA Pro-

tein des Wildtyps (s.III.4.2). Offenbar ist es daher in anderer Weise oder weniger fest an die äußere Membran gebunden als das Protein des Wildtyps. Es wurde daher untersucht, ob sich Wildtyp- und Mutanten-Protein z.B. bei einer Verdauung mit Proteasen unterschiedlich verhalten. Behandelt man Zellhüllen mit Trypsin oder Pronase, dann wird das OmpA Protein teilweise zu charakteristischen Fragmenten von 24 000 bzw. 19 000 dalton abgebaut (53,114). Diese Fragmente entstehen dadurch, daß ein COOH-terminaler Teil des Proteins abgespalten wird, während der NH_2-Terminus erhalten bleibt (114). Das OmpA Protein sollte also in ganzen Zellen weder von Trypsin noch von Pronase angegriffen werden, da der COOH-Terminus auf der Innenseite der äußeren Membran liegt und deshalb für die impermeablen Proteasen nicht zugänglich ist. WITHOLT et al. (133) fanden aber, daß die äußere Membran nur in Anwesenheit von Mg^{2+} für Trypsin undurchlässig ist. Ohne Mg^{2+} dagegen kann es durch die äußere Membran gelangen. Für Pronase ist das gleiche Verhalten denkbar. Es wurden deswegen ganze Zellen von Wildtyp UH 100/pTU 100 und Mutante UH 100/pTU 105 mit Trypsin bzw. Pronase verdaut (mit und ohne Mg^{2+}) und beobachtet, ob das pTU 105-Protein aufgrund eines anderen Arrangements in der äußeren Membran für Proteasen auch von außen zugänglich ist. In Abwesenheit von Mg^{2+}, wenn die äußere Membran für Trypsin permeabel ist, hätte UH 100/pTU 105 vom Wildtyp abweichende Fragmente liefern können.

a.) Trypsinverdauung. Zellen von UH 100/pTU 100 bzw. seiner Plasmidmutante UH 100/pTU 105 wurden in der Anwesenheit von EDTA oder $MgCl_2$ mit Trypsin inkubiert. Nach 6 Std. Inkubation wurde die Verdauung mit Trypsin-Inhibitor abgebrochen und von den Zellen Hüllen präpariert. Abb.12,Spalten 1-6 zeigt die SDS-PAGE der Zellhüllen. Das pTU 105-Protein wird in Anwesenheit von EDTA partiell verdaut, wobei ein kleineres Fragment von ca. 29 000 dalton auftaucht (Spalte 6), während das Wildtyp-Protein praktisch nicht angegriffen wird[+)] und nur ein Bruchteil

---

[+)] Fußnote s. nächste Seite.

zu dem 24 000 dalton Trypsinfragment aus Zellhüllen abgebaut wird (Spalte 5). In Anwesenheit von Mg^{2+} ist das OmpA Protein des Wildtyps völlig geschützt, das Mutanten-Protein hingegen wird zu etwa 50% partiell abgebaut, während die andere Hälfte von Trypsin nicht angegriffen wird (Spalte 4).

b.) Pronaseverdauung. Der Wildtyp UH 100/pTU 100 und UH 100/pTU 105 wurden auf die gleiche Weise, wie für Trypsin beschrieben, jedoch mit Pronase, für 6 Std. inkubiert und anschließend von den Zellen die Hüllen präpariert. Eine SDS-PAGE dieser Hüllen zeigt, daß das OmpA Protein des Wildtyps in ganzen Zellen gegen Pronase völlig resistent ist (Abb.12, Spalten 9, 11). Das Protein der Mutante aber wird sowohl in Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+} als auch von 5 mM EDTA durch Pronase partiell verdaut, wobei ein spezifisches Fragment entsteht (Spalten 10, 12). Dieses Pronasefragment der Mutante besteht aus 64 NH_2-terminalen Aminosäuren des OmpA Proteins (U. Chen-Schmeisser, persönliche Mitteilung).

III.5 Zwischenbilanz

Das pro-OmpA Protein wurde in Minizellen aufgrund der Immunfällung und einer partiellen Proteolyse mit V8-Protease und Chymotrypsin identifiziert. Versuche zur Anreicherung des Vorläufers, um ihn in größeren Mengen isolieren zu können, scheiterten sowohl in Minizellen als auch in normalen Zellen. Das pro-OmpA Protein mußte deshalb in Minizellen radioaktiv markiert und aus SDS-Polyacrylamidgelen isoliert werden. Eine NH_2-terminale Teilsequenzierung konnte durchgeführt werden, nachdem die DNA-Sequenz des gesamten OmpA Gens bekannt war und folglich der Vorläufer gezielt mit bestimmten Aminosäuren radioaktiv markiert werden konnte. Auf diese Weise

---

+) Damit steht dieser Befund im Widerspruch zu der Beobachtung von WITHOLT et al. (133), daß in Abwesenheit von Mg^{2+} die äußere Membran für Trypsin permeabel ist: das Wildtyp-Protein wird am COOH-Terminus nicht verkürzt.

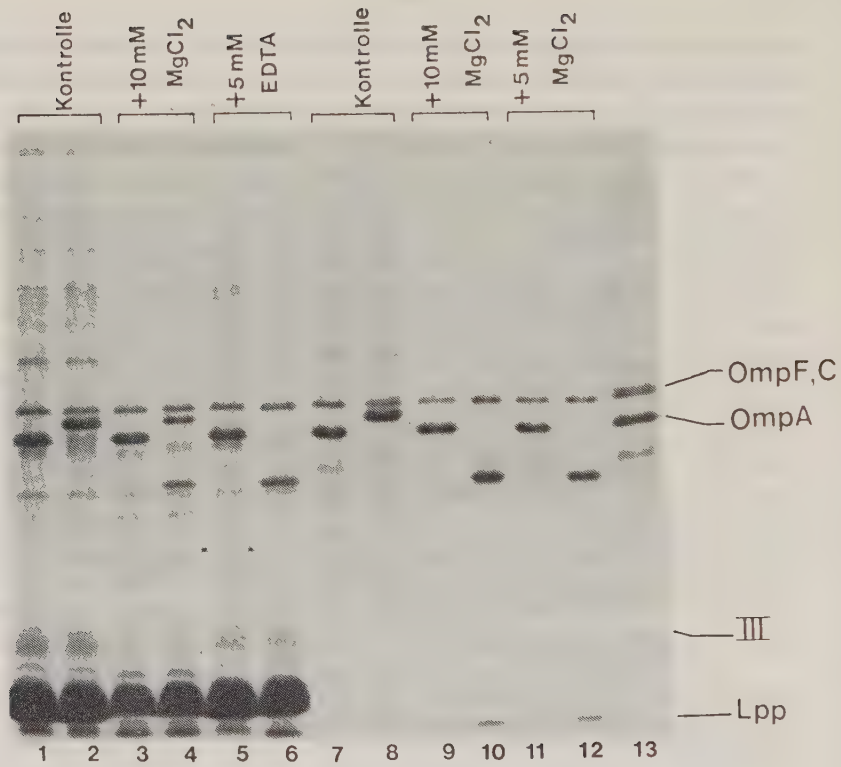


Abb.12 Trypsin- und Pronaseverdauung von ganzen Zellen (Coomassie-Färbung). Zellen von UH 100 mit dem Plasmid pTU 100 und der Plasmidmutante UH 100/pTU 105 wurden mit Trypsin bzw. Pronase behandelt und anschließend die Zellhüllen auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spalten 1-6 Trypsinverdauung; Spalten 7-12 Pronaseverdauung. Zellhüllen des Wildtyps UH 100/pTU 100 (1,3,5 bzw. 7,9,11); Zellhüllen der Mutante UH 100/pTU 105 (2,4,6 bzw. 8,10,12); äußerer Membranstandard aus Zellhüllen von P 400 (13). Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4. Die mit * * markierte Bande stellt das 24 000 dalton Trypsinfragment des Wildtyps dar (s. Text). Die dicken Banden im unteren Teil des Gels stammen von dem Trypsin-Inhibitor, wie eine Kontrolle ohne Inhibitor zeigte. Lpp = Lipoprotein.

wurde die durch die DNA-Sequenz vorhersagbare Primärstruktur des pro-OmpA Proteins auf proteinchemischer Ebene bestätigt. Von der Mutante UH 100/pTU 105 vermutete man irrtümlich, daß sie in der Signalabspaltung defekt ist und folglich den Vorläufer anhäuft, denn das entsprechende Protein lief elektrophoretisch ganz ähnlich dem pro-OmpA Protein. Es konnte aber gezeigt werden, daß es sich um eine Mutation im Strukturgen handelt, die dazu führt, daß das fragliche Protein in der äußeren Membran eine andere Konformation als das Wildtyp-Protein annimmt. Als Resultat ist es mit dem Detergens Sarkosyl leichter extrahierbar und wird durch Proteasen von außen angegriffen, wobei im Fall von Pronase 64 NH_2-terminale Aminosäuren abgespalten werden. Eine Verdauung der Zellhüllen der Mutante mit Pronase läßt ein Fragment zurück, das am COOH-Terminus mit dem entsprechenden Pronasefragment von Wildtyp-Zellhüllen (53,114) identisch ist, wie die Aminosäure-Sequenzierung des Fragments zeigte (U. Chen-Schmeisser, persönliche Mitteilung). Das OmpA Protein der Mutante befindet sich also tatsächlich in der äußeren Membran.

III.6 Das pro-OmpA Protein in P 400-6

III.6.1 Puls-Versuch bei 37°C bzw. 25°C

In den bisher geschilderten Versuchen konnte der Vorläufer des OmpA Proteins nur in Minizellen nachgewiesen werden. Minizellen spiegeln jedoch keinesfalls normale Verhältnisse wider: sie akkumulieren den Vorläufer in großen Mengen und er läßt sich nur teilweise in das reife Protein überführen (U. Henning, persönliche Mitteilung). Minizellen erlauben daher keine Aussage über die normalen Verhältnisse in vivo. Es war deshalb von großem Interesse, Bedingungen in vivo zu finden, unter denen das pro-OmpA Protein in normalen, intakten Zellen zu finden ist. Solche Bedingungen existieren tatsächlich, wenn die Zellen bei 25°C wachsen.
Zellen von P 400-6 wurden bei 37°C und 25°C mit einem Puls von 60 Sek. mit ^{35}S-Methionin markiert, beschallt und abzentrifugiert (1 Std. 100 000 g). Sowohl der Niederschlag

(= Zellhüllen) als auch ein entsprechendes Aliquot des Überstandes wurden mit Antiserum gegen das OmpA Protein gefällt und die Präzipitate mit der SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.13). Man sieht, daß sich bei 37°C mehr als 90% des OmpA Proteins im Niederschlag befindet. Ein kleiner Teil ist auch im Überstand zu sehen, aber in keinem Fall ist eine Vorläufer-Bande zu erkennen (Spalten 1, 3). Findet der Puls aber bei 25°C statt, dann erscheint ein neues Protein im Überstand des Sonikats (Spalte 4).

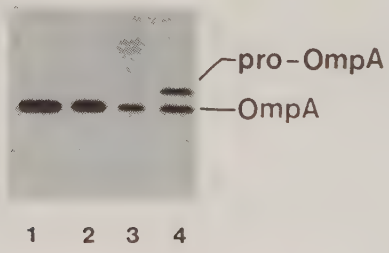


Abb.13 Puls-Markierung des OmpA Proteins in vivo (Fluorographie). Zellen von P 400-6 wurden mit ^{35}S-Methionin für 60 Sek. pulsmarkiert, in eine Zellhüllen- und eine lösliche Fraktion aufgetrennt und mit Anti-OmpA Serum gefällt. Die Immunpräzipitate wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Immunpräzipitate von Zellhüllen, bei 37°C markiert (1); bei 25°C markiert (2); lösliche Fraktion, 37°C (3); lösliche Fraktion, 25°C (4). Die Lage der Proteinbanden wurde anhand eines markierten Standards von Minizellen aus χ 984/pTU 100 ermittelt.

Die Molekulargewichts-Differenz zu dem OmpA Protein ist dieselbe, wie bereits in Minizellen für das pro-OmpA Protein beobachtet, nämlich ca. 2000 dalton. Die Vermutung lag daher nahe, daß es sich bei diesem Protein um den Vorläufer des OmpA Proteins handelt. Deshalb wurde ein "pulse-chase" Versuch bei 25°C durchgeführt.

III.6.2 "Pulse-chase" Versuch bei 25°C

In einem "pulse-chase" Versuch wurden Zellen von P 400-6 für 45 Sek. mit ^{35}S-Methionin markiert und dann mit unmarkiertem Methionin der "chase" eingeleitet. Nach verschiedenen "chase"-Intervallen (10, 45 und 255 Sek.) wurden die Zellen mit Ultraschall geöffnet, die Hüllen abzentrifugiert (1 Std. bei 100 000 g) und nach der Immunfällung mit Anti-OmpA Serum eine SDS-PAGE durchgeführt. Abb.14 zeigt, daß sich das um ca. 2000 dalton größere Protein innerhalb von 5 Min. quantitativ in das OmpA Protein überführen läßt.

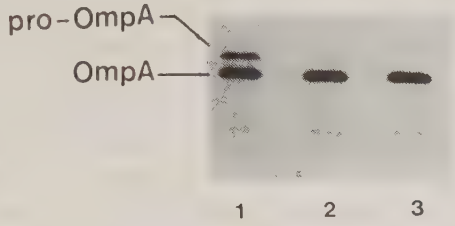


Abb.14 Abspaltung der Signalsequenz in vivo bei 25°C (Fluorographie). Zellen von P 400-6 wurden bei 25°C mit ^{35}S-Methionin pulsmarkiert und der "chase" nach 45 Sek. durch Zugabe von unmarkiertem Methionin eingeleitet. Nach verschiedenen "chase"-Intervallen (s.u.) wurden Proben entnommen, beschallt und mit Anti-OmpA Serum gefällt. Eine SDS-PAGE schloß sich an. 10 Sek. "chase" (1); 45 Sek. "chase" (2); 255 Sek. "chase" (3). Die Intensitätszunahme der OmpA-Proteinbande ist auf der Originalautoradiographie noch gut zu erkennen, geht aber bei der photographischen Übertragung verloren. Die Lage der Proteinbanden wurde anhand eines Standards von markierten Minizellen aus χ984/pTU 100 bestimmt.

Da 80% der Radioaktivität bereits nach dem kürzesten "chase"-Intervall (10 Sek.) in dem reifen Protein war, konnte eine wirklich quantitative Analyse des "pulse-chase", die statistisch signifikant gewesen wäre, nicht durchgeführt werden.

Fig.2 zeigt die graphische Auswertung eines Zählversuchs, bei dem Vorläuferbanden und solche des reifen Proteins aus dem Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt wurden. Während die Menge an radioaktivem Vorläufer abnimmt, steigt die des reifen OmpA Proteins an.

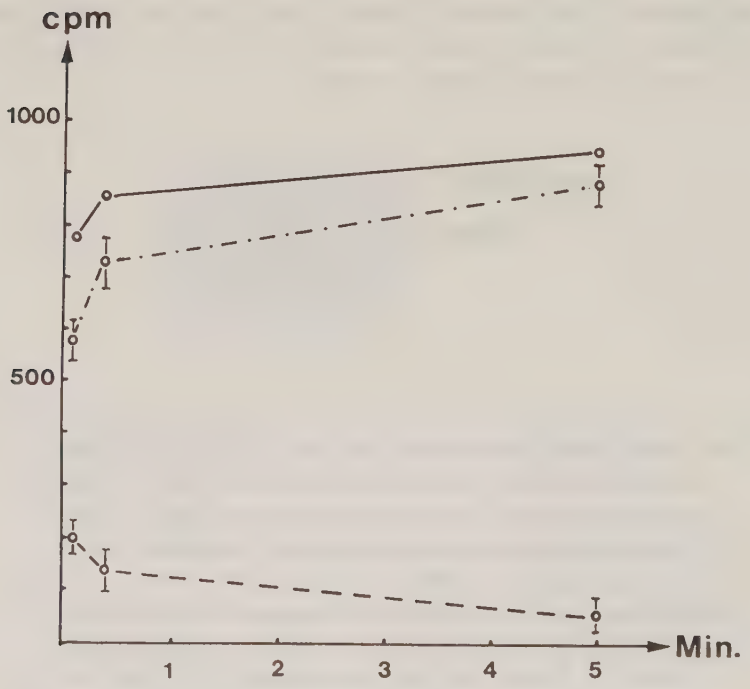


Fig.2 Graphische Darstellung eines "pulse-chase" Versuchs bei 25°C. Zellen von P 400-6 wurden, wie in "Methoden" beschrieben, einem "pulse-chase" unterzogen. Die zu den "chase"-Intervallen von 10, 45 und 255 Sek. entnommenen Zellen wurden mit Ultraschall aufgebrochen, die Zellhüllen abzentrifugiert und nach der Immunfällung mit Anti-OmpA Serum einer SDS-PAGE unterworfen. Nach der Fluorographie wurden die entsprechenden Banden aus dem getrockneten Gel

b.w.

Zwei kleinere Proteine (Molekulargewichte ca. 27 000 bzw. 25 000), die bereits in Minizellen mit dem Plasmid pTU 100 (kloniertes OmpA Gen) beobachtet wurden (s. Abb.2, Pfeil), konnten ebenfalls mit Antiserum gefällt werden, wobei sich das größere Protein während dem "chase" offensichtlich in das Kleinere überführen ließ. Diese von mir Satellitenproteine genannten Polypeptide wurden ebenfalls ausführlich untersucht (s.III.8). Auch sie stellen Produkte des OmpA Gens dar.

III.6.3 Lokalisierung des pro-OmpA Proteins

Der Puls Versuch bei 25°C zeigte, daß sich der Vorläufer des OmpA Proteins nach 1 Std. Zentrifugation im Überstand und nicht in der Zellhüllenfraktion befand (Abb.13, Spalte 4). Neben der Möglichkeit, daß der Vorläufer in gelöster Form vorliegt, gab es noch eine zweite Interpretation: da die innere Membran eine geringere spezifische Dichte als die äußere Membran hat, wurde in Betracht gezogen, daß nach 1 Std. Zentrifugation bei 100 000 g hauptsächlich die äußere Membran sedimentiert, während die leichtere innere Membran im Überstand verbleibt. Um die Frage zu klären, ob sich das pro-OmpA Protein in der inneren Membran befindet oder in gelöster Form vorliegt, wurden a.) zwei verschiedene Arten der Zellhüllenpräparation verglichen und b.) extra lange zentrifugiert (16 Std. bei 100 000 g).
Zellen von P 400-6 wurden bei 25°C für nur 10 Sek. mit ^{35}S-Methionin puls-markiert (um, verglichen mit dem reifen Protein, eine gute Ausbeute an Vorläufer zu erhalten) und

---

Fig.2 Fortsetzung
geschnitten, mit Perhydrol/NH_4OH behandelt (s. "Methoden") und gezählt. Ein bandenfreies Gelstück entsprechender Größe ergab einen Hintergrund von 120 cpm, der von den Zählwerten abgezogen wurde. Dieser hohe Hintergrund entsteht durch Chemiluminiszenz, wie sie bei Peroxiden in Szintillatoren auftreten kann. Die Balken geben den mittleren Fehler aus drei unabhängigen Zählungen an.

entweder mit Ultraschall oder mit der Frenchpress aufgebrochen. Zellhüllen und Überstand der Lysate wurden durch 16 Std. Zentrifugation bei 100 000 g gewonnen und zusammen mit einem Aliquot der Gesamt-Lysate immungefällt (Abb.15). Es zeigt sich, daß in den Gesamt-Lysaten ungefähr doppelt soviel Vorläufer wie reifes OmpA Protein vorhanden ist (Spalten 1, 4). Die Verteilung von Vorläufer in der Zellhüllen- und der löslichen Fraktion ist abhängig von der Präparationsmethode: bei beschallten Zellen bleibt der Hauptteil des markierten pro-OmpA Proteins in der löslichen Fraktion (Spalte 3), während bei Zellen, die mit der Frenchpress aufgebrochen wurden, kein Vorläufer in der löslichen Fraktion zu sehen war (Spalte 6). Die Ausbeute an markiertem Vorläufer in der Zellhüllen- und der löslichen Fraktion war offensichtlich weniger als 100% (vgl. z.B. Spalte 4 mit Spalten 5, 6). Dies ist wohl auf eine unvollständige Lösung der Zellhüllen während der Vorbereitung für die Immunfällung zurückzuführen.

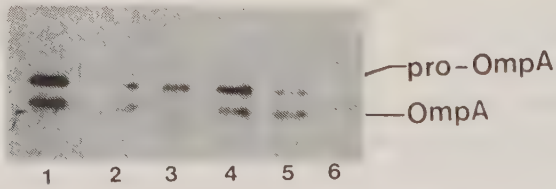


Abb.15 Lokalisierung des pro-OmpA Proteins (I): Effekt von verschiedenen Präparationsmethoden für die Zellhüllen (Fluorographie). Zellen von P 400-6 wurden für 10 Sek. bei 25°C mit ^{35}S-Methionin markiert und entweder mit Ultaschall oder der Frenchpress aufgebrochen. Die Lysate wurden 16 Std. bei 100 000 g abzentrifugiert und sowohl Zellhüllen- als auch lösliche Fraktionen immungefällt und mit einer SDS-PAGE analysiert. Immunpräzipitate des Gesamt-Sonikates (1); der Zellhüllenfraktion (2) und der löslichen Fraktion (3); Immunpräzipitate des gesamten Frenchpress-Lysates (4); der Zellhüllenfraktion (5) und der löslichen Fraktion (6). Die Lage der Proteinbanden wurde anhand eines Standards von markierten Minizellen bestimmt.

Die Ergebnisse des Versuches ließen vermuten, daß der Vorläufer mit der inneren Membran verbunden ist, und daß er sich in dieser membran-assoziierten Form nach Frenchpress-Lyse, nicht aber nach der Ultraschallbehandlung abzentrifugieren läßt. Um diese Annahme zu prüfen, wurde das Frenchpress-Lysat über einen Sucrosegradienten zentrifugiert, um die innere und äußere Membran zu trennen. Die einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden zu fünf Portionen vereinigt, wobei Portion I bzw. III die sichtbaren Banden der inneren bzw. der äußeren Membran enthielten. Eine Immunfällung aller fünf Portionen zeigte eindeutig, daß das pro-OmpA Protein mit der inneren Membran sedimentiert, ebenso wie Teile des OmpA Proteins (Abb.16). Portion V enthält Proteine, die nicht in den Gradienten gewandert sind.

III.6.4 Der Vorläufer aus P 400-6 bei verschiedenen Lösungstemperaturen

Der Vorläufer aus Minizellen läuft im Gegensatz zu dem reifen Protein elektrophoretisch immer gleich, unabhängig von der Lösungstemperatur (s.III.1.3). Nachdem Bedingungen gefunden worden waren, bei denen sich der Vorläufer auch in normalen Zellen nachweisen läßt, konnte die Hitzemodifizierbarkeit auch in diesem Fall untersucht werden.
Zellen von P 400-6 wurden bei 25°C mit ^{35}S-Methionin für 10 Sek. puls-markiert und nach einem "chase" von weiteren 10 Sek. in einem 2%igen SDS-Puffer (s. Legende zu Abb.17) gelöst. Dies geschah entweder bei 50°C oder bei 100°C. Anschließend wurden die gelösten Zellen einer Immunfällung mit Anti-OmpA Serum unterzogen, die Immunpräzipitate entweder bei 50°C oder bei 100°C gelöst und eine SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie durchgeführt. Abb.17 zeigt, daß auch in normalen Zellen der Vorläufer durch die Lösungstemperatur nicht in seiner elektrophoretischen Beweglichkeit beeinflußt wird. Aber auch das reife OmpA Protein, das in diesem Versuch maximal 20 Sek. alt ist, zeigt keine Abhängigkeit von der Lösungstemperatur, sondern wandert immer mit einem Molekulargewicht von 33 000. Bei 50°C findet sich

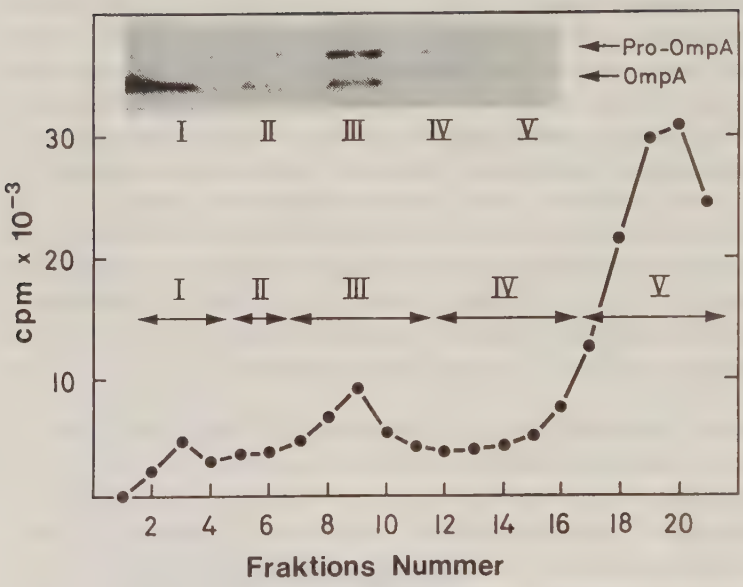


Abb.16 Lokalisierung des pro-OmpA Proteins (II): Trennung von innerer und äußerer Membran auf einem Sucrosegradienten. Zellen von P 400-6 wurden puls-markiert, wie in der Legende zu Abb.15 beschrieben, mit einer Frenchpress aufgebrochen und auf Sucrosegradienten aufgetrennt (s. "Methoden"). 5 µl einer jeden Fraktion wurden gezählt, der Rest vereinigt (I-V) und immungefällt. Der Einsatz zeigt die Fluorographie einer SDS-PAGE der Immunpräzipitate der Fraktionen I-V. Die Probenvolumen für die Immunfällung wurden so gewählt, daß ein direkter Mengenvergleich des immungefällten Proteins der einzelnen Fraktionen möglich war. Die OmpA Bande in Spalte I ist ein Artefakt und rührt von einer zu stark markierten Kontrollprobe in der Spalte links daneben her. Diese Kontrollprobe bestand aus markierten Minizellen von χ 984/pTU 100, um die Proteinbanden identifizieren zu können.

also in diesem Fall das OmpA Protein nicht in der erwarteten 28 000 dalton Form. Auch frisch synthetisiertes reifes Satellitenprotein (s.III.8) zeigt bei 50°C dasselbe Molekulargewicht wie bei höheren Temperaturen (Äbb.17).
Die Immunfällung ist in diesem Versuch nicht zufriedenstellend, was darauf zurückzuführen ist, daß die Zellen nicht mit Ultraschall aufgebrochen, sondern direkt in SDS gekocht wurden. Die Proben wurden dabei durch die freigestzte DNA schleimig, was die Immunfällung negativ beeinflußte.

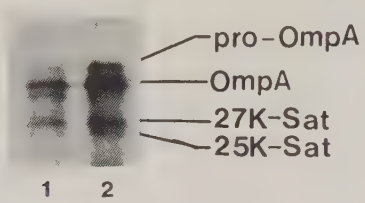


Abb.17 Der Vorläufer aus P 400-6 bei verschiedenen Lösungstemperaturen (Fluorographie). Zellen von P 400-6 wurden für 10 Sek. puls-markiert, nach einem "chase" von weiteren 10 Sek. mit 300 mM Tris-HCl pH 7.5/30% (w/v) Glycerin/12% SDS 1:6 verdünnt und bei 50°C für 1 Std. oder bei 100°C für 5 Min. gelöst. Anschließend wurden die Proben wie in "Methoden" beschrieben, jedoch ohne Staphylococcus-Zellen zu verwenden, mit Anti-OmpA Serum gefällt. Die Immunpräzipitate wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Sämtliche Lösungsvorgänge bei 50°C (1), bei 100°C (2). 27K-Sat/25K-Sat = 27 000 bzw. 25 000 dalton Satellitenproteine. Die Lage der Proteinbanden wurde anhand eines Standards von markierten Minizellen aus χ984/pTU 100 ermittelt.

III.7 OmpA-kodierte in vitro Proteinsynthese

III.7.1 In vitro Synthese mit verschiedenen Plasmiden

Nachdem der Vorläufer des OmpA Proteins als Zwischenprodukt in vivo nachgewiesen werden konnte (s.III.6.2), war es von großem Interesse, nach den für die Abspaltung der Signalsequenz erforderlichen Bedingungen bzw. Faktoren zu suchen. Dafür bot sich ein zellfreies Proteinsynthese-System an, denn hier sollte nur der Vorläufer synthetisiert werden, wobei man die Signalabspaltung gezielt durch Variation verschiedener Faktoren auslösen bzw. beeinflußen könnte (26). Das in vitro System wurde, wie in "Methoden" beschrieben, angesetzt und die Proteinsynthese durch Zugabe der DNA gestartet. Nach 1 Std. Inkubation wurden die Syntheseansätze mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Abb.18 zeigt die Fluorographie. Wird die Proteinsynthese von pTU 100 bzw. dem Mutantenplasmid pTU 105 (s.III.4) kodiert,dann wird ausschließlich der Vorläufer des OmpA Proteins synthetisiert (Spalte 2) bzw. der entsprechende Mutantenvorläufer (Spalte 3). Auch mit dem Mutantenplasmid pTU 202, einem Abkömmling von pBR 325 (s. Tab.3), wird nur das pro-OmpA Protein gebildet. Spalte 6 zeigt die von pBR 325 kodierte Proteinsynthese. Die am stärksten markierte Bande muß dem Chloramphenicol-Charakter des Plasmids zugeordnet werden, denn sie verschwindet bei der Klonierung des OmpA Gens (bzw. seiner Mutanten) in das Plasmid, wodurch die Zellen Chloramphenicol-sensitiv werden. Die Spalten 7-12 zeigen die Immunfällung der entsprechenden Ansätze aus Spalten 1-6. Es wird nur der Vorläufer mit Anti-OmpA Serum gefällt, d.h. in vitro wird kein reifes OmpA Protein synthetisiert.

Ein Teil der im Folgenden beschriebenen Versuche ist mit dem Plasmid pTU 100 durchgeführt worden, während für den anderen Teil pTU 202 verwendet wurde. Dies hat rein historische Gründe. Das ursprünglich verwendete Plasmid pTU 100 ist ein Abkömmling von pSC 101, dessen Kopienzahl/Zelle sehr niedrig ist (~ 2-3); die Ausbeute an DNA ist entsprechend gering. Durch Isolierung der Mutante ompA-72, die nur noch geringe Mengen an OmpA Protein synthetisiert (14,22), wurde es dann möglich,

dieses Allel in pBR 325 zu klonieren, einem Plasmid mit hoher Kopienzahl/Zelle, ohne daß ein lethaler Gen-Dosis-Effekt durch Überproduktion von OmpA Protein auftritt. Das resultierende Plasmid pTU 202 konnte aufgrund der hohen Kopienzahl in weitaus größeren Mengen als pTU 100 isoliert werden und wurde deshalb später bevorzugt verwendet.

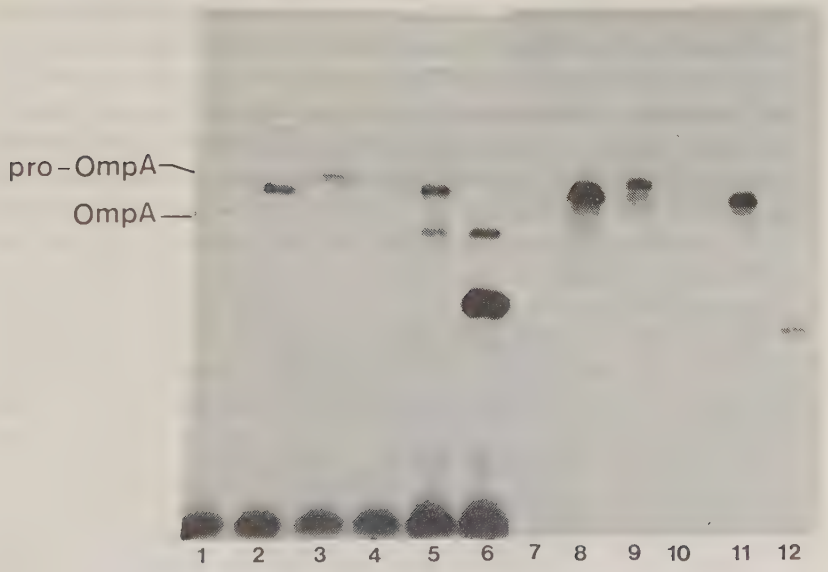


Abb.18 In vitro Proteinsynthese mit verschiedenen Plasmiden (Fluorographie). Eine in vitro Proteinsynthese wurde durchgeführt, wie in "Methoden" beschrieben, die Ansätze danach mit Probenpuffer für die SDS-PAGE versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Ohne Plasmid (1); + 2.4 µg pTU 100 (2); + 1.7 µg pTU 105 (3); + 2.4 µg pSC 101 (4); + 1.7 µg pTU 202 (5); + 1.7 µg pBR 325 (6). Spalten 7-12: Immunfällungen der in vitro Synthesen ohne Plasmid (7); mit pTU 100 (8); pTU 105 (9); pSC 101 (10); pTU 202 (11) und mit pBR 325 (12). Die Lage der Proteinbanden wurde mit einem Standard von markierten Minizellen aus χ 984/pTU 100 bestimmt.

III.7.2 Versuche zur Signalabspaltung in vitro I: Effekt von Membranen

Da in vitro nur das pro-OmpA Protein, nicht aber das reife OmpA Protein gebildet wird, wurde die Synthese mit pTÜ 100 in Anwesenheit von innerer bzw. äußerer Membran oder von Zellhüllen aus E. coli durchgeführt. Wenn die Abspaltung der Signalsequenz während der Proteinsynthese und an die Einlagerung in eine Membran gekoppelt abläuft (Signalhypothese), dann hätte die Anwesenheit von Membranstrukturen zur Signalabspaltung führen können. Abb.19 zeigt aber, daß dies unter den gegebenen Bedingungen nicht der Fall ist: keine der Membranpräparationen hat einen Effekt, und es ist nur pro-OmpA Protein im Ansatz zu finden. Bei den entsprechenden Immunfällungen mit Anti-OmpA Serum (Spalten 4-6) wird nur der Vorläufer ausgefällt.

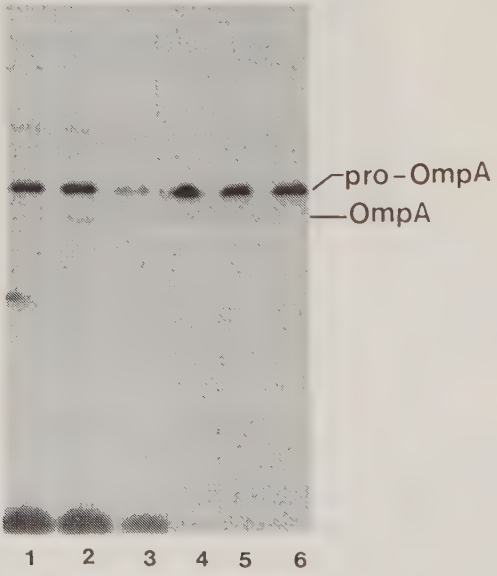


Abb.19

III.7.3 Versuche zur Signalabspaltung in vitro II: Effekt von Membranen in Kombination mit Triton X-100

MANDEL & WICKNER (77) konnten zeigen, daß die Anwesenheit von Membranen aus E. coli und Triton X-100 während der in vitro Synthese bei dem Hüllprotein des Phagen M13 zur Abspaltung der Signalsequenz führte. Ferner konnten sie eine post-translationelle Signalabspaltung erreichen, wenn während des ganzen Versuches Triton X-100 anwesend war und wenn sie nach der in vitro Synthese innere Membranen zugaben. Die Bedingungen dieser Versuche wurden auf die Synthese des pro-OmpA Proteins mit dem Plasmid pTU 202 angewendet. Abb.20 zeigt die Fluorographie einer SDS-PAGE von dieser Versuchsreihe. Die in vitro Proteinsynthese erfolgte unter Verwendung von innerer (Spalten 1-4) bzw. äußerer Membran (Spalten 5-8) von UH 100/pTU 100. Spalten 9-11 zeigen verschiedene Kontrollen ohne Membranen. Sollten Komponenten nach der Synthese zugegeben werden, so wurde die radioaktive Synthese mit einem Überschuß an unmarkiertem Methionin gestoppt und anschließend eine weitere Std. inkubiert. In Tab.5 sind die einzelnen Versuchsansätze zum besseren Verständnis tabelliert. Unabhängig von der Anwesenheit innerer und äußerer Membranen oder von Triton X-100 und gleichgültig, ob man diese Komponenten während oder nach der

---

Abb.19 In vitro Synthese des Vorläufers in Anwesenheit von Membranen (Fluorographie). Eine in vitro Proteinsynthese mit 1.7 µg pTU 100 erfolgte, wie in "Methoden" beschrieben, unter Zusatz von 12 µl innerer (1) bzw. äußerer (2) Membransuspension (s.II.8.3) oder 12 µl Zellhüllensuspension (3). Die Zellhüllen wurden aus 10 ml Kultur von P 400 hergestellt (s. "Methoden") und in 1 ml desselben Puffers resuspendiert, wie für die innere und äußere Membran verwendet. Spalten 4-6: entsprechende Immunfällungen der Spalten 1-3 mit Anti-OmpA Serum. Zur Identifizierung der pro-OmpA Bande wurde ein Standard aus markierten Minizellen von χ 984/pTU 100 verwendet.

in vitro Synthese zugibt, sieht man keine Anzeichen für eine Signalabspaltung bei dem pro-OmpA Protein.

Abb.20	innere Membran	äußere Membran	Triton X-100
1	+ (w)	-	-
2	+ (n)	-	-
3	+ (w)	-	+ (w)
4	+ (n)	-	+ (n)
5	-	+ (w)	-
6	-	+ (n)	-
7	-	+ (w)	+ (w)
8	-	+ (n)	+ (n)
9	-	-	+ (w)
10	-	-	+ (n)
11	-	-	-

Tab.5 Variation verschiedener Zusätze zu dem in vitro Proteinsynthese-System. (w) = während der Synthese, (n) = nach der Synthese.

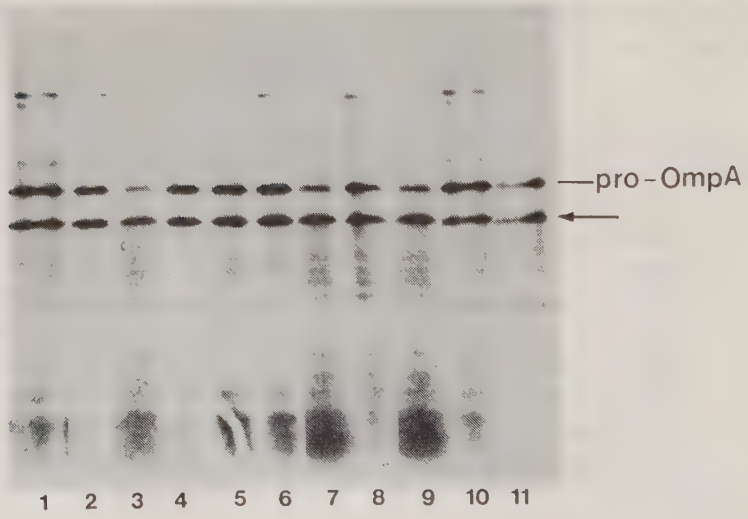


Abb.20

III.7.4 Trypsinempfindlichkeit des in vitro Vorläufers

Da es in Anwesenheit von Membranen unter den verschiedensten Bedingungen nicht zu einer Abspaltung des Signalpeptides kam, wurde folgende Möglichkeit in Betracht gezogen: der in vitro Vorläufer faltet sich bereits in Abwesenheit von Membranen zu einer für die in vitro Synthese spezifischen Konformation. In dieser Konformation könnte er gegen die Signalpeptidase geschützt sein. Um Aussagen über die Konformation des in vitro synthetisierten Vorläufers zu erhalten, wurde im Anschluß an eine solche Synthese mit dem Plasmid pBR 325 und seinem Derivat pTU 202 Trypsin bzw. Pronase zugegeben und eine weitere Std. inkubiert. pBR 325 kodiert für zwei Proteine (Abb. 21, Spalte 1), von denen das größere durch Trypsin zum größten Teil abgebaut wird (Spalte 2). Durch die Klonierung der OmpA DNA in pBR 325 bedingt, kodiert das resultierende Plasmid pTU 202 nur noch für das größere der beiden pBR 325-Proteine und natürlich für das pro-OmpA Protein (Spalte 4). Die Trypsinbehandlung führt bei pTU 202 zum Verschwinden dieser beiden Proteine, wobei ein neues Fragment auftaucht (Spalte 5).Dieses Fragment entsteht durch teilweise Trypsinverdauung des pro-OmpA Proteins und nicht des pBR 325-spezi-

---

Abb.20 In vitro Synthese des Vorläufers in Anwesenheit von Membranen und Triton X-100 (Fluorographie). Die in vitro Proteinsynthese (s."Methoden") mit dem Plasmid pTU 202 wurde unter Zusatz von 6 µl innerer bzw. äußerer Membransuspension (s. Legende zu Abb. 19) und 1% (v/v) Triton X-100 in Kombinationen durchgeführt, wie sie aus Tab.5 zu ersehen sind. Sämtliche Ansätze enthielten als DNA 0.4 µg pTU 202. Sollten die Zusätze nach der in vitro Synthese zugegeben werden, dann wurde der radioaktive Einbau mit 200 mM L-Methionin abgestoppt und anschließend eine weitere Std. bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit Probenpuffer für die SDS-PAGE versetzt, elektrophoretisch aufgetrennt und fluorographiert. Die pro-OmpA Bande wurde mit einem Standard aus markierten Minizellen von χ 984/pTU 100 identifiziert. ⟶ das pBR 325-spezifische Protein (s. auch Abb.18, Spalte 5).

fischen Proteins, wie ein Vergleich von Spalte 5 mit Spalte 2 zeigt: das von pBR 325 kodierte Protein verschwindet zwar ebenfalls fast vollständig nach Trypsinbehandlung, wird aber nicht zu einem entsprechenden Trypsinfragment abgebaut (Spalte 2). Eine Verdauung mit Pronase führt weder bei pBR 325 noch bei pTU 202 zu spezifischen Fragmenten; die fraglichen Proteine werden von Pronase völlig verdaut (Spalten 3, 6).

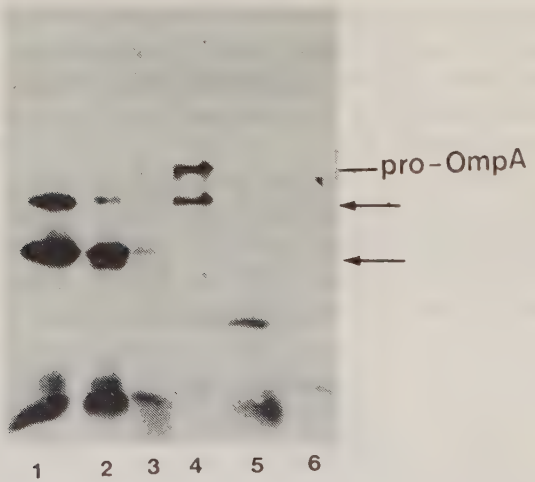


Abb.21 Trypsin- und Pronaseempfindlichkeit des in vitro Vorläufers (Fluorographie). Wie in "Methoden" beschrieben, wurde mit dem Plasmid pBR 325 und seinem Derivat pTU 202 eine in vitro Proteinsynthese durchgeführt, die radioaktive Synthese mit 200 mM L-Methionin abgestoppt und mit Trypsin bzw. Pronase für 1 Std. bei 37 °C nachinkubiert. Die Versuchsansätze wurden anschließend mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Die in vitro Synthese lief ab in Anwesenheit von 0.4 µg pBR 325 (1-3) oder 0.4 µg pTU 202 (4-6). Nachinkubation ohne Proteasen (1, 4); mit 100 µg/ml Trypsin (2,5); mit 100 µg/ml Pronase (3,6). Die pro-OmpA Bande wurde mit einem Standard aus markierten Minizellen von χ 984/pTU 100 identifiziert. ——► die von pBR 325 kodierten Proteine (s. auch Abb.18, Spalte 6).

Weitere Versuche zur Trypsinempfindlichkeit des Vorläufers wurden mit pTU 202 durchgeführt und zwar in Abhängigkeit von Membranen und Lipopolysaccharid (LPS). LPS hat einen spezifischen Effekt auf das OmpA Protein: es verleiht ihm in vitro einen teilweisen Schutz gegen Trypsin, das ein Fragment von 24 000 dalton erzeugt (114). Den gleichen Effekt hat auch die Assoziation in vivo mit der äußeren Membran, wo Trypsin ebenfalls das 24 000 dalton Fragment erzeugt (114). Die Frage war, ob auch der in vitro Vorläufer des OmpA Proteins mit LPS oder Membranen in der Weise assoziieren kann, daß er teilweise gegen Proteolyse durch Trypsin geschützt ist.
Es wurden also Ansätze in verschiedenen Kombinationen mit LPS bzw. Zellhüllen von E. coli versetzt und im Anschluß an die in vitro Synthese mit oder ohne Trypsin für eine weitere Std. inkubiert. Abb.22 zeigt die Fluorographie der SDS-PAGE von diesen Versuchsansätzen. Die Ergebnisse sind in Tab.6 zusammengefaßt.

	Zusätze während[1] bzw. nach[2] der Synthese			
Abb.21	Membranen[1]	LPS[1]	Trypsin[2]	Trypsinfragment
1	-	-	+	I
2	-	+	+	II
3	-	+	-	
4	+	-	+	I
5	-	-	-	

Tab.6 Schema zur Trypsinempfindlichkeit des in vitro Vorläufers.

Der Trypsinabbau des in vitro Vorläufers ohne Zusätze während der Synthese führt zu dem Trypsinfragment I, mit einem Molekulargewicht von ca. 15 000 (Abb.22, Spalte 1). Die Anwesenheit von LPS während der Synthese führt dazu, daß kein dem Trypsinfragment I entsprechendes Peptid entstehen kann. Eine Bande, die ein LPS-spezifisches Trypsinfragment darstellen könnte, ist mit II bezeichnet und hat ein Molekulargewicht von ca. 19 000

(Spalte 2). Zugabe von Membranen während der in vitro Synthese hat keinen spezifischen Effekt, denn es entsteht das Trypsinfragment I, wie es auch ohne Zusätze während der Synthese auftaucht (Spalte 4).

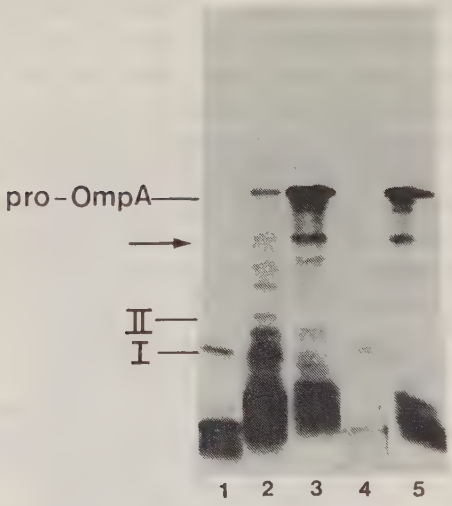


Abb.22 Trypsinempfindlichkeit des in vitro Vorläufers in Abhängigkeit von Membranen und LPS (Fluorographie). Die in vitro Proteinsynthese mit dem Plasmid pTU 202 verlief wie beschrieben (s. "Methoden"). Die Synthese in Anwesenheit von Membranen (6 µl Zellhüllensuspension, s. Legende zu Abb.19) oder 170 µg/ml LPS wurde in den angegebenen Kombinationen durchgeführt (s. Tab.6). Im Anschluß an die in vitro Synthese von radioaktivem Protein (Stop durch 200 mM L-Methionin) wurde eine weitere Std. bei 37°C mit 100 µg/ml Trypsin oder ohne Trypsin (s. Tab.6) inkubiert. Die pro-OmpA Bande wurde mit einem Standard aus markierten Minizellen von χ 984/pTU 100 identifiziert. ⟶ das pBR 325-spezifische Protein (s. auch Abb.18, Spalte 5).

III.8 Die Satellitenproteine des OmpA Gens

Wie bereits mehrfach erwähnt und aus den Abbildungen 2, 14 und 17 zu ersehen, lassen sich neben dem OmpA Protein und seinem Vorläufer zwei weitere Proteine mit Molekulargewichten von ca. 27 000 und 25 000 dalton mit Anti-OmpA Serum ausfällen. Es wurde deshalb untersucht, ob diese sog. Satellitenproteine ebenfalls Produkte des OmpA Gens darstellen. Da von dem Mutantenplasmid pTU 105 aufgrund einer Mutation im Strukturgen ein OmpA Protein kodiert wird, das eine etwas langsamere elektrophoretische Beweglichkeit besitzt (s.III.4), sollten auch die fraglichen Satellitenproteine der Mutante etwas langsamer laufen, wenn sie tatsächlich Produkte des OmpA Gens darstellen.
Minizellen mit dem Plasmid pTU 100 und dem Mutantenplasmid pTU 105 wurden mit ^{35}S-Methionin markiert, die Zellen in Probenpuffer für die SDS-PAGE entweder bei Raumtemperatur oder bei 100°C gelöst und einer SDS-PAGE unterzogen. Abb. 23 zeigt, daß in der OmpA Mutante ebenfalls Satellitenproteine auftauchen, die im selben Maße langsamer laufen wie Mutantenvorläufer und -OmpA Protein (Spalten 3, 4). Ferner zeigt das obere der Satellitenproteine dasselbe Phänomen wie das pro-OmpA Protein (s. dazu III.1.3): es wandert im Gegensatz zu dem unteren Satellitenprotein bzw. dem OmpA Protein unabhängig von der Lösungstemperatur immer gleich weit, wird aber auf dem Gel von dem OmpA Protein überdeckt, das bei 50°C gelöst mit einem ähnlichen Molekulargewicht läuft, nämlich 28 000 (Spalte 1). Dasselbe Verhalten findet sich, mit entsprechend verschobenen Banden, auch bei der Mutante mit dem Plasmid pTU 105 (Spalte 2).
Aufgrund desselben eigenartigen Unterschiedes in der Hitzemodifizierbarkeit wurde vermutet, daß es sich bei den Satellitenproteinen ebenfalls um Vorläufer und Produkt handelt, wobei dann beide Proteine am COOH-terminalen Ende verkürzt sein sollten. Da in der Aminosäuresequenz des OmpA Proteins (28) nur zwei Cystein-Reste ganz am COOH-Terminus (Position 290 und 302) vorkommen, konnte eine Markierung der Minizellen mit ^{35}S-Cystein einen Hinweis liefern: beide

Satellitenproteine werden sowohl in dem Wildtyp als auch in der Mutante nicht mit ^{35}S-Cystein markiert (Abb.23, Spalten 5, 6). Offenbar fehlt ihnen also ein Teil der COOH-terminalen Sequenz.

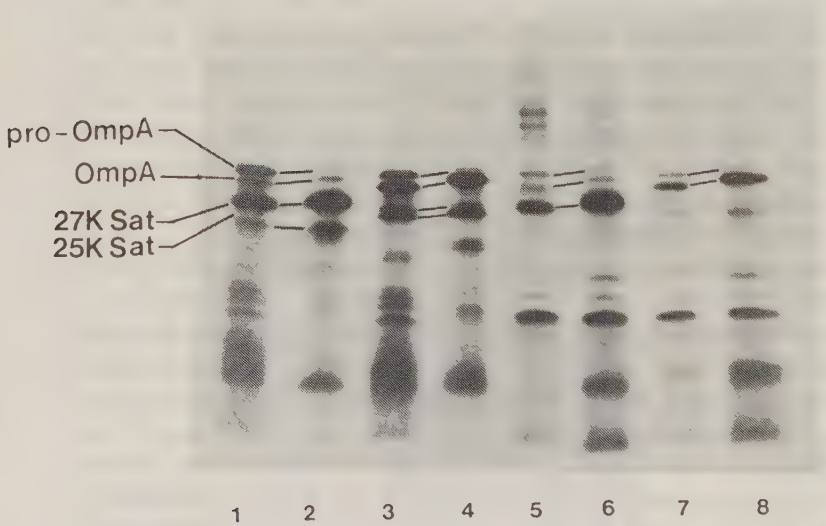


Abb.23 Die Satellitenproteine als Produkte des OmpA Gens (Fluorographie). Minizellen von χ 984 mit pTU 100 bzw. dem Mutantenplasmid pTU 105 wurden radioaktiv markiert, in Probenpuffer für die SDS-PAGE direkt gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Spalten 1-4: Markierung mit ^{35}S-Methionin; Spalten 5-8: Markierung mit ^{35}S-Cystein. Minizellen bei 50°C gelöst (Spalten 1,2 bzw. 5,6); bei 100°C gelöst (Spalten 3,4 bzw. 7,8). 27K-Sat/25K-Sat = 27 000 bzw. 25 000 dalton Satellitenproteine.

Nicht nur in Minizellen, sondern auch in normalen Zellen von E. coli findet man das reife Satellitenprotein sogar in färbbaren Mengen. Einen ersten Hinweis lieferte die Beobachtung, daß sich in P 400 eine dem reifen Satellitenpro-

tein aus Minizellen entsprechende Bande mit Coomassie-Blau anfärben läßt (Abb.6, Pfeil). Den Beweis, daß es sich dabei auch in normalen Zellen um das reife Satellitenprotein handelt, lieferten Versuche mit UH 100 (Abb.24): die Zellhüllen wurden einer SDS-PAGE unterworfen, wobei das fragliche Protein aus UH 100/pTU 105 etwas langsamer läuft als das aus UH 100/pTU 100 (Spalten 2, 3). Dieselbe langsamere Beweglichkeit findet man auch bei Minizellen mit dem Plasmid pTU 105 (Abb.23). In Zellen von UH 100, die gegen den OmpA-spezifischen Phagen K3h1 (78) resistent sind, taucht dagegen weder das OmpA Protein noch eine dem Satellitenprotein in Stärke entsprechende Bande auf (Spalte 1). Das Satellitenprotein ist demnach auch in normalen Zellen von E. coli in färbbaren Mengen vorhanden.

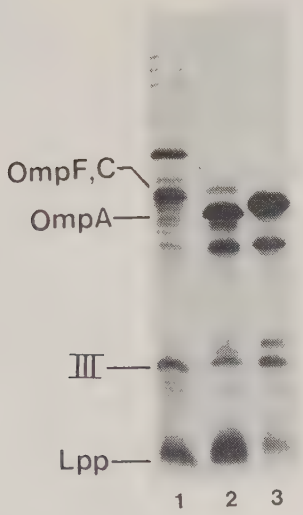


Abb.24 Färbbares Satellitenprotein in normalen Zellen (Coomassie-Färbung). Zellen von UH 100, UH 100/pTU 100 und UH 100/pTU 105 wurden in Penassay-Medium (Difco) angezogen, ihre Zellhüllen präpariert und einer SDS-PAGE unterzogen. UH 100 (1); UH 100/pTU 100 (2); UH 100/pTU 105 (3). Zur Bezeichnung der Proteine s. Tab.1, S.4.

IV. D I S K U S S I O N

Der Vorläufer des OmpA Proteins in Minizellen

Die Zellmembranen von E. coli enthalten unter normalen Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an pro-OmpA Protein. Nur unter semi-in vitro Bedingungen, die die äußere Membran teilweise zerstören (47,115) oder durch Erniedrigung der Membranfluidität (105) konnten geringe Mengen an Vorläufer des OmpA Proteins radioaktiv nachgewiesen werden. In Minizellen jedoch, die das OmpA Plasmid pTU 100 enthalten (22,54), wird neben dem OmpA Protein in größeren Mengen ein weiteres plasmid-kodiertes Protein synthetisiert, von dem man bereits vermutete, daß es den Vorläufer des OmpA Proteins darstellt (54). In Übereinstimmung mit der Annahme, daß sezernierte Proteine mit einer zusätzlichen Signalsequenz synthetisiert werden, zeigt das Protein einen elektrophoretischen Molekulargewichtsunterschied von etwa 2000 dalton, verglichen mit dem OmpA Protein. Die Verwandtschaft dieses größeren Polypeptids mit dem OmpA Protein zeigt sich in seiner Fällbarkeit mit dem OmpA-spezifischen Antiserum. Bei einer partiellen Proteolyse mit V8-Protease bzw. Chymotrypsin erhält man bei dem mutmaßlichen Vorläufer und dem OmpA Protein sehr ähnliche Peptidmuster; ein weiterer Hinweis für die enge Verwandtschaft zwischen den beiden Proteinen. Bei dem Abbau mit V8-Protease tauchen zwei Peptide auf (Abb.3,mit Pfeilen gekennzeichnet), die nur bei dem OmpA Protein vorhanden sind, während bei dem Vorläufer stattdessen ein um ca. 2000 dalton größeres Peptid auftritt. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich hierbei um die gleichen Proteasefragmente handelt, die im Fall des Vorläufers eine zusätzliche Signalsequenz enthalten. Solche um ca. 2000 dalton differierende Peptide tauchen auch bei der partiellen Proteolyse der Arabinose- und Maltose-Bindeproteine (101) und des lamB Proteins (79,101) mit V8-Protease auf. Im Fall der Chymotrypsinverdauung fallen besonders bei der höchsten Proteasekonzentration drei Bandenpaare auf, wobei jeweils die obere der beiden Proteinbanden

sehr viel stärker ist und nur bei dem Vorläufer auftaucht. Die unteren Proteinbanden liegen auf gleicher Höhe wie entsprechende Peptidbanden des OmpA Proteins und könnten dadurch entstanden sein, daß Chymotrypsin bei einem Teil der Peptide zusätzlich die Signalsequenz abgespalten hat. Anhand der Daten zur Immunfällung und zur partiellen Proteolyse kann man mit Sicherheit davon ausgehen, daß sich in Minizellen neben dem OmpA Protein auch sein Vorläufer anhäuft.

"Pulse-chase" Versuche zeigen, daß sich auch nach einem längeren "chase" ein Teil des Vorläufers nicht in das OmpA Protein überführen läßt (U. Henning, persönliche Mitteilung). Minizellen, die ein Plasmid mit dem klonierten Gen für das Protein a aus der äußeren Membran von E. coli enthalten, bilden ebenfalls hauptsächlich den entsprechenden Vorläufer (44), genauso wie dies für die Plasmid-kodierte ß-Lactamase aus Minizellen der Fall ist (2). Warum das pro-OmpA Protein in Minizellen in großen Mengen gebildet wird, während man es auf der anderen Seite in normalen Zellen von E. coli nicht finden kann, ist nicht geklärt. Folgende Möglichkeiten könnten zutreffen: (a) Minizellen werden an den Zellpolen der Mutterzelle abgeschnürt. Die Zusammensetzung der Zellmembran an diesen Stellen, insbesondere in Bezug auf ihre postulierte proteolytische Äktivität, könnten von der normalen Zusammensetzung abweichen und dazu führen, daß die Abspaltung des Signalpeptides erschwert ist. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die äußere Membran von Minizellen dichter ist als die der Mutterzellen (72) und daß eine Trennung von innerer und äußerer Membran über Sucrosegradienten im Gegensatz zu normalen Zellen schwierig und nur unzureichend möglich ist (2,45,72).
(b) Da die Minizellen als einzige genetische Information das Plasmid mit dem OmpA Gen enthalten, wird in großen Mengen OmpA Protein synthetisiert und "verstopft", vielleicht an spezifischen Insertionsstellen wie sie von DE LEIJ et al. (70,71) beobachtet wurden, die äußere Membran. Als Folge davon blieben Vorläufermoleküle auf ihrem Sekretionsweg unterwegs ungespalten liegen.

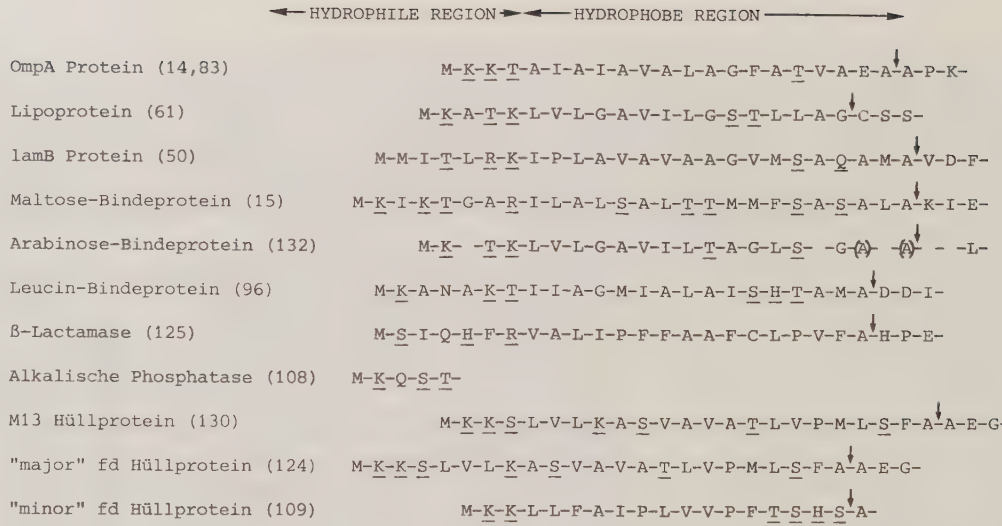
Die Signalsequenz des OmpA Proteins

Versuche, in Minizellen den bereits in größeren Mengen vorhandenen Vorläufer mit Lokalanästhetika wie Procain oder mit Protease-Inhibitoren wie Tosyl-lysyl-chloromethylketon oder p-Aminobenzamidin weiter anzureichern, schlugen fehl. Normale Zellen jedoch zeigen eine gewisse Resistenz gegen den OmpA-spezifischen Phagen Tu II*, wenn man sie mehrere Generationen lang in Procain wachsen läßt. Dennoch ist weder in den Zellhüllen noch in der löslichen Fraktion nach der SDS-PAGE pro-OmpA Protein in färbbaren Mengen zu finden. Daß Phenäthylalkohol den Vorläufer des OmpA Proteins in geringen radioaktiv nachweisbaren Mengen anhäuft, wußte man bereits (47). Da Procain und der Alkohol den gleichen Effekt auf die äußere Membran von E. coli haben (65), ist es wahrscheinlich, daß auch Procain zur Anhäufung des pro-OmpA Proteins führt. Als Folge könnte die Menge der für den Phagen an der Zelloberfläche zugänglichen Proteinmoleküle abnehmen,und die Zellen würden, wie beobachtet, gegen niedrige Phagentiter resistent. Man kann sich aber auch vorstellen, daß Procain die Architektur der äußeren Membran langfristig so verändert, daß der Zugang der Phagen zu ihrem Rezeptorprotein erschwert wird.
Eine gelelektrophoretische Analyse der Zellmembranen aus Sphäroplasten von normalen Zellen zeigt keine färbbaren Mengen an pro-OmpA Protein. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von METCALFE & HOLLAND (80), die für das Matrixprotein aus der äußeren Membran zeigen konnten, daß bei Sphäroplasten weder membrangebunden noch im Medium ein Vorläufer gefunden wird. Stattdessen wird das reife Matrixprotein in das Medium ausgeschieden. Sphäroplasten bilden auch im Fall des Lipoproteins keine nachweisbaren Mengen an Vorläufer (66), vielmehr häuft sich das reife Lipoprotein in der Cytoplasmamembran an.
Es gelang also nicht, den Vorläufer außer in Minizellen in größeren Mengen zu akkumulieren. Da auch alle Versuche mißlangen, das pro-OmpA Protein und das reife Produkt chromatographisch zu trennen, wurde das erstere schließlich aus Minizellen durch präparative Gelelektrophorese rein darge-

stellt. Die NH_2-terminale Sequenzierung des radioaktiv markierten Minizell-Vorläufers weist in Position -21 ^{35}S-Methionin auf, in den Positionen -20 und -19 ^{14}C-Lysin und in -16 und -14 ^{3}H-Isoleucin. Diese Daten stimmen nicht mit der NH_2-terminalen Aminosäuresequenz des reifen OmpA Proteins überein (28). Der beobachtete Molekulargewichtsunterschied des Vorläufers von ca. 2000 dalton ist also auf eine zusätzliche Sequenz am NH_2-Terminus des OmpA Proteins zurückzuführen. Während diese Arbeit angefertigt wurde, konnte von BECK & BREMER (14) die komplette Sequenz des OmpA Gens ermittelt werden (und der für die Signalsequenz kodierende Teil auch von MOVVA et al. [83]), so daß auf eine vollständige Sequenzierung des Signalpeptids verzichtet werden konnte. Tab.7 zeigt die NH_2-terminale Sequenz des pro-OmpA Proteins im Vergleich mit den bis dato bekannten Signalsequenzen anderer sezernierter Proteine aus E. coli. Sie stimmt in allen Punkten mit den von INOUYE geforderten Eigenschaften für eine Signalsequenz (loop-Modell, Ref.59) überein: an eine kurze, hydrophile Region, die durch die Anwesenheit von zwei Lysin-Resten stark basisch ist, schließt sich eine längere hydrophobe Region an, bis hin zur Spalstelle. Die dem Signalpeptid zugehörige Aminosäure an der Spaltstelle ist, wie auch in den meisten bekannten anderen Fällen, ein Alanin. Auf die mögliche Bedeutung dieser Eigenschaften für die Sekretion des Proteins ist in der Einleitung näher eingegangen worden (s. auch Ref.59). Zusätzlich fällt die außerordentlich starke Häufung von Alanin-Resten auf: fast jede zweite Aminosäure in der hydrophoben Region der Signalsequenz ist ein Alanin. Das genaue Molekulargewicht der zusätzlichen Signalsequenz beträgt 2556.

Das OmpA Protein der Plasmidmutante pTU 105

Das pTU 105-Protein stellt nicht, wie anfänglich angenommen, den Vorläufer des OmpA Proteins dar, sondern ist auf eine Mutation im Strukturgen zurückzuführen. Diese Mutation verleiht dem pTU 105-Protein die langsamere elektrophoretische Beweglichkeit verglichen mit dem Wildtyp-Protein. Es befin-



Tab.7 Die bis dato bekannten Signalsequenzen einiger sezernierter Proteine aus E. coli. Der Pfeil zeigt die Stelle der Signalabspaltung an. Hydrophile Aminosäuren sind unterstrichen; Symbole in Klammern bezeichnen nicht eindeutig identifizierte Aminosäuren und freie Stellen solche, die noch nicht identifiziert werden konnten. A = Ala, C = Cys, D = Asp, E = Glu, F = Phe, G = Gly, H = His, I = Ile, K = Lys, L = Leu, M = Met, N = Asn, P = Pro, Q = Gln, R = Arg, S = Ser, T = Thr, V = Val.

det sich aber genau wie das OmpA Protein des Wildtyps in der äußeren Membran, wie ein osmotischer Schock und die Trennung von innerer und äußerer Membran zeigen. Trotzdem unterscheidet es sich von dem Wildtyp-Protein bezüglich seiner Anordnung in der äußeren Membran, denn es ist im Gegensatz zu dem normalen OmpA Protein schon in intakten Zellen empfindlich gegenüber Proteasen und verhält sich abweichend gegenüber dem Detergens Sarkosyl. So wird bei der Extraktion von Zellhüllen mit Sarkosyl unabhängig von An- oder Abwesenheit von Mg^{2+} das Mutanten-Protein von Sarkosyl größtenteils gelöst. Dies deutet darauf hin, daß das Mutanten-Protein nicht fest in die äußere Membran eingelagert und somit gegen Sarkosyl nicht völlig geschützt ist, denn nur innere Membranproteine, nicht aber solche aus der äußeren Membran werden durch Sarkosyl gelöst (29,41). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung bleibt das OmpC Protein aus der äußeren Membran (s. Tab.1, S.4) in Sarkosyl unlöslich, während das Wildtyp-OmpA Protein ebenfalls zu 80-90% Sarkosyl-löslich ist und nur in Anwesenheit von 5 mM Mg^{2+} das erwartete Verhalten zeigt, nämlich fast völlige Unlöslichkeit in Sarkosyl. Da die benutzten Stämme,durch das Plasmid bedingt, große Mengen an OmpA Protein bzw. pTU 105-Protein synthetisieren, könnte diese Überproduktion dazu führen, daß ein Teil der fraglichen Proteine nicht normal in die äußere Membran eingelagert und folglich von Sarkosyl größtenteils herausgelöst werden kann. Erst die Stabilisierung der äußeren Membran durch ausreichende Mg^{2+}-Konzentrationen bewirkt, daß das OmpA Protein Sarkosyl-unlöslich wird[+)]. Auf jeden Fall ist das pTU 105-Protein im Gegensatz zu dem Wildtyp-

---

[+)] Auch in Minizellen von χ 984/pTU 100, die Plasmid-bedingt große Mengen an OmpA Protein synthetisieren, ist es größtenteils Sarkosyl-löslich und wird erst mit 5 mM Mg^{2+} Sarkosyl-unlöslich. Ähnliches gilt für Triton X-100, das wie Sarkosyl nur die innere Membran löst (97,111): auch hier wird das OmpA Protein erst mit steigenden Mg^{2+}-Konzentrationen Detergens-unlöslich.

Protein in Anwesenheit der höchsten Mg^{2+}-Konzentration grösstenteils Sarkosyl-löslich und damit nicht so fest in der äußeren Membran verankert.
Die Tatsache, daß das pTU 105-Protein in ganzen Zellen sowohl mit Trypsin als auch mit Pronase zu spezifischen Fragmenten abgebaut wird, zeigt, daß dieses Protein in der äusseren Membran in einer anderen Konformation vorliegen muß. Diese Konformation erlaubt den Proteasen einen Angriff von außen, während dies bei dem Wildtyp nicht möglich ist. Um herauszufinden, welcher Teil des pTU 105-Proteins aus der äußeren Membran herausragt und somit von Proteasen abgespalten werden kann, wurde das Pronasefragment aus ganzen Zellen der Mutante isoliert und seine Aminosäuresequenz untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß am NH_2-Terminus ein Stück von 64 Aminosäuren abgespalten wird (U. Chen-Schmeisser, persönliche Mitteilung). In dieser Hinsicht ist von Interesse, daß das pTU 105-Protein trotz der Mutation als Transmembranprotein in die äußere Membran eingelagert wird, wie die Protease-Anfälligkeit von außen her und auch seine in vivo Aktivität als Rezeptor für den Phagen K3h1 (78) zeigt.

Der Vorläufer des OmpA Proteins in vivo

Das OmpA Protein wird in vivo, wenigstens bei 25°C, als ein Vorläufermolekül synthetisiert. Nach einem Puls von 10 Sek. ist ungefähr doppelt soviel Vorläufer wie reifes Protein vorhanden, was darauf hindeutet, daß die Synthese der meisten, vielleicht auch aller Vorläufermoleküle bereits vollendet ist, bevor es zur Abspaltung des Signalpeptides kommt (würde die Signalabspaltung bereits während der Synthese erfolgen, dürfte kein Vorläufer auftauchen, sondern ein Gemisch aus verschieden langen Proteinketten). Ein "pulse-chase" Versuch bei 25°C zeigt, daß der Vorläufer innerhalb von 5 Min. quantitativ in das reife OmpA Protein überführt werden kann. Bei dem beobachteten Vorläufer kann es sich also nicht um ein biosynthetisches Nebenprodukt handeln, während der Hauptteil des OmpA Proteins bereits im Laufe der Proteinsynthese durch die Abspaltung des Signalpeptides entsteht.

Die neu synthetisierten Vorläufermoleküle sedimentieren ausschließlich mit der inneren Membran. Ein kleiner Teil der immunfällbaren Radioaktivität aus der inneren Membran (ca.10%) befindet sich aber in reifem OmpA Protein, was darauf hindeutet, daß die Signalabspaltung in der inneren Membran stattfindet. In der Tat konnte der Vorläufer der alkalischen Phosphatase durch Vesikel der inneren Membran gespalten werden, wobei das reife Protein entstand (27). Allerdings wurden von anderen Autoren proteolytische Aktivitäten in der äußeren Membran gefunden (76,104). Es bleibt nachzuweisen, ob diese Akrivitäten in vivo für die Abspaltung der Vorläufersequenz zuständig sind. Sphäroplasten häufen das reife Lipoprotein und nicht den Vorläufer in der inneren Membran an (61). Dies deutet ebenfalls darauf hin, daß die Signalabspaltung bei äußeren Membranproteinen bereits in der Cytoplasmamembran stattfindet.

Es ist keinesfalls auszuschließen, daß die mit der Cytoplasmamembran sedimentierenden Vorläufermoleküle in der Zelle als lösliche Proteine existieren. Sie könnten so (a) während der Isolierung an die innere Membran binden oder (b) als Aggregate während der Sucrosegradienten - Zentrifugation zusammen mit der inneren Membran sedimentieren. Die Tatsache, daß die Sedimentation des Vorläufers von verschiedenen Methoden der Zell-Lyse abhängt, spricht allerdings gegen diese Interpretationen. Sollte der Vorläufer des OmpA Proteins aber als lösliche Form im Cytoplasma vorliegen, dann könnte die beobachtete Kinetik der Signalabspaltung die des Bindens des Vorläufers an die innere Membran darstellen und nicht die der Signalabspaltung per se. In diesem Fall würde die Bindung von Vorläufer an die innere Membran von einer sofortigen Abspaltung der Signalsequenz begleitet sein. Diese Reaktionsfolge wird für die Synthese des Hüllproteins von dem Phagen M13 (63) und der TEM ß-Lactamase (68) gefordert.

Die Befunde dieser Arbeit scheinen im Widerspruch zu früheren Puls-Versuchen zu stehen, bei denen keine Vorläuferstufen der Hauptproteine aus der äußeren Membran nachgewiesen werden konnten (64,69,70). Selbst ein kurzer Puls bei 25°C war nicht erfolgreich (71,73,74). Wie also läßt sich diese Diskrepanz er-

klären? Zuerst läßt sich an stammspezifische Unterschiede denken. Allerdings ist das pro-OmpA Protein bei 25°C nicht nur in P 400-6, sondern auch in UH 100/pTU 100 zu finden (Daten nicht gezeigt), so daß zumindest für E. coli K-12 der Einwand nicht zutrifft. Zweitens könnten Versuche, membrangebundene Vorläufer nachzuweisen, scheitern, wenn die Zellen mit Ultraschall lysiert werden (64,69,73,74), denn die innere Membran scheint selbst nach einer 16-stündigen Zentrifugation nicht vollständig zu sedimentieren. Drittens sind Vorläufer nur in sehr geringen Mengen vorhanden, so daß sie wahrscheinlich ohne spezifische Antiseren (64,69,70, 71,74) in der Cytoplasmamembran oder in Gesamt-Zell-Lysaten nicht nachweisbar sind. Viertens sind in den Puls-Versuchen von LIN et al. (73,74) die Zellen bei 37°C angezogen und vor dem Puls für nur 5 Min. bei 25°C vorinkubiert worden, während in den hier geschilderten Experimenten die Zellen mehrere Generationen lang bei 25°C vorwuchsen. Eine zu kurze Vorinkubation bei 25°C könnte für eine Anhäufung von Vorläufer nicht ausreichen.

Versuche mit dem OmpF Protein (109, s. auch Tab.1, S.4), die parallel unter den gleichen Bedingungen wie für das OmpA Protein durchgeführt wurden, zeigen das gleiche Bild: nach 10 Sek. Puls ist hauptsächlich pro-OmpF Protein zu finden; es sedimentiert neben geringen Mengen an reifem Protein mit der inneren Membran und läßt sich mit einem "pulse-chase" quantitativ in das OmpF Protein überführen. Vergleicht man in den "pulse-chase" Experimenten die Kinetiken der Signalabspaltung, dann sieht man, daß das pro-OmpF Protein eine Halbzeit von 30 Sek. hat (31), während das pro-OmpA Protein etwas schneller in das reife Protein übergeführt wird. Eine genauere Analyse der Halbzeiten, insbesondere für das pro-OmpA Protein, ist aber nötig, um detaillierte Aussagen machen zu können.

Das Verhältnis von OmpA : pro-OmpA Protein ist nach einem Puls von 45 Sek. größer als das von OmpF : pro-OmpF Protein (31). Dies bedeutet nicht unbedingt, daß das pro-OmpA Protein schneller gespalten wird als das pro-OmpF Protein. Vielmehr könnte auch die Signalabspaltung früher einsetzen. In jedem

Fall ist das Auftauchen von reifem OmpF Protein in der äußeren Membran im Vergleich zu dem OmpA Protein verzögert. Eine ähnliche Beobachtung wurde von LIN & WU (74) gemacht, obwohl diese Autoren keine Vorläuferstufen der beiden Proteine bei 25°C finden konnten. Sie schlossen daraus, daß die Unterschiede im Auftauchen von reifen Proteinen in der äußeren Membran auf unterschiedliche Synthesegeschwindigkeiten zurückzuführen sind. DE LEIJ et al. (70) fanden Hinweise, daß die Proteine der äußeren Membran als wachsende Ketten, also noch mit den Ribosomen verbunden, in die äußere Membran eingelagert werden. In beiden Fällen müßte die Signalabspaltung und die Translokation in die äußere Membran an die Proteinsynthese gekoppelt sein. Die von uns beobachteten Befunde (31) lassen eine andere Erklärung zu: der zeitliche Unterschied im Auftauchen von OmpF Protein relativ zu dem OmpA Protein ist auf eine langsamere oder verzögert eintretende Abspaltung des Signalpeptides zurückzuführen.
Die Einlagerung von äußeren Membranproteinen ist generell langsamer als die von Proteinen aus der inneren Membran (64, 73,74). Auch dies könnte mit einer langsameren oder verzögerten Signalabspaltung (verglichen mit inneren Membranproteinen) und nicht mit einer langsameren Syntheserate begründet werden. Die Abspaltung der Signalsequenz und die Translokation in die äußere Membran scheinen also, zumindest bei 25°C, im Fall des OmpA- und des OmpF Proteins nicht an die Proteinsynthese gekoppelt zu sein.

Der Vorläufer des OmpA Proteins in vitro

Bei der in vitro Proteinsynthese mit OmpA DNA wird ein Polypeptid gebildet, das etwa 2000 dalton größer ist als das OmpA Protein. Folgende Daten zeigen, daß es sich hierbei um den Vorläufer handelt: (a) das Protein wird nur mit DNA synthetisiert, die für das OmpA Protein kodiert, (b) es ist als einziges Protein mit OmpA-spezifischem Antiserum fällbar und (c) DNA der Mutante mit pTU 105, deren OmpA Protein elektrophoretisch etwas langsamer läuft, kodiert für ein entsprechend langsamer laufendes in vitro Polypeptid. Be-

reits für mehrere Proteine der äußeren Membran und des Periplasmas wurden Vorläuferstufen in vitro gefunden (2,27, 79,96,132). Eine mögliche Ausnahme bilden die an der Konjugation beteiligten tra-Proteine (2).
Eine Abspaltung der Signalsequenz konnte bei dem pro-OmpA Protein durch Zugabe von inneren bzw. äußeren Membranen oder von gesamten Zellhüllen während oder nach der in vitro Synthese nicht erreicht werden, während für das lamB Protein (79), die alkalische Phosphatase (27) und zwei Phagen-Hüllproteine aus der inneren Membran (26,77) eine Abspaltung des Signalpeptides durch Membranfraktionen beobachtet wurde. Wie läßt sich also bei dem OmpA Protein das Ausbleiben der Signalabspaltung in vitro erklären? Während bei der in vitro Synthese des OmpA Proteins die verwendeten Membranfraktionen durch Ultraschall-Präparation gewonnen wurden, sind in den späteren Versuchen Membranen aus Frenchpress-Präparationen verwendet worden (26,27,79). H. INOUYE & BECKWITH (58) fanden ursprünglich eine Signalabspaltung bei der alkalischen Phosphatase durch äußere Membranen, die nach Ultraschall-Behandlung isoliert worden waren, konnten dann aber zeigen, daß hierbei nicht authentische alkalische Phosphatase entsteht, sondern ein etwas kürzeres Molekül (27). In letzterem Versuch verwendeten sie Membranen, die mit der Frenchpress präpariert worden waren und konnten neben der "abnormen" Signalabspaltung durch äußere Membranen eine korrekte Spaltung des Vorläufers zu authentischer alkalischer Phosphatase durch innere Membranen erreichen. Sie argumentierten, daß nur Frenchpress-Membranen eine korrekte Abspaltung der Signalsequenz in vitro veranlassen können, nicht aber Ultraschall-Membranen. Die Verwendung von Ultraschall-Membranen könnte also für das Ausbleiben der Signalabspaltung bei dem pro-OmpA Protein verantwortlich sein, obwohl parallel auch Membranen verwendet wurden, die statt mit Ultraschall durch heftiges Schütteln mit Glasperlen aufgebrochen wurden. Außerdem konnten WICKNER & MANDEL (77) sowohl mit Frenchpress- als auch mit Ultraschall-Membranen eine Abspaltung der Signalsequenz bei dem M13 Hüllprotein erzielen. Verschiedene Autoren konnten eine Stimulierung

der Signalabspaltung in vitro durch Membranen mit Hilfe von nichtionischen Detergentien wie Triton X-100 (77) oder Nikkol (26,27) beobachten. Auch die Verwendung von Triton X-100 während oder erst nach der in vitro Synthese in Verbindung mit Membranen führt jedoch im Fall des pro-OmpA Proteins nicht zur Abspaltung des Signalpeptides. Ein Beitrag zu der Frage, ob die Signalabspaltung bei Vorläufern äußerer Membranproteine während (co-translationell) oder erst im Anschluß an die Proteinsynthese (post-translationell) erfolgt, konnte also mit diesen Experimenten nicht geleistet werden, denn bei dem pro-OmpA Protein konnte in keinem Fall das Signalpeptid abgespalten werden. Es bleibt zu klären, ob diese Daten physiologische Bedeutung haben, d.h. ob die gesuchte Protease-Aktivität in der Tat von den Protease-Aktivitäten verschieden ist, die für andere Proteine beschrieben worden sind.

Die Konformation des pro-OmpA Proteins

Wird das OmpA Protein in SDS bei Raumtemperatur gelöst, so läuft es elektrophoretisch mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 28 000. Erst Kochen läßt es in etwa entsprechend seinem tatsächlichen Molekulargewicht von 35 159 (28) wandern. Dieses als Hitzemodifizierbarkeit bezeichnete Phänomen wurde damit erklärt, daß bei niedrigen Lösungstemperaturen bis etwa 70°C das OmpA Protein durch SDS nicht vollständig denaturiert werden kann, während es bei 100°C als nahezu völlig entfaltetes Molekül vorliegt(28). Der Vorläufer des OmpA Proteins aber zeigt weder in Minizellen noch in normalen Zellen ein solches Verhalten. Vielmehr wandert er unabhängig von der Lösungstemperatur immer annähernd entsprechend seinem tatsächlichen Molekulargewicht von 37 715, wie es mit der Signalsequenz (14,83) berechnet werden kann. Für dieses Verhalten gibt es eine einfache Erklärung, nämlich daß der Vorläufer eine andere Konformation als das reife OmpA Protein besitzt und deshalb im Gegensatz zu dem OmpA Protein bei Raumtemperatur nicht teilweise gegen Denaturierung durch SDS geschützt ist. Reifes OmpA Protein, daß maximal 20 Sek. alt ist, zeigt das gleiche elektrophoretische

Verhalten wie der Vorläufer: es läuft bei 50°C gelöst mit dem gleichen Molekulargewicht wie bei 100°C, nämlich mit 33 000 dalton. Anscheinend ist also neu entstandenes OmpA Protein , mindestens in den ersten 20 Sek. noch in einer anderen Konformation (der gleichen, wie die des Vorläufers?) und lagert sich erst später in die endgültige Konformation um.

Obwohl das Verhalten des pro-OmpA Proteins gegenüber unterschiedlichen Lösungstemperaturen im Fall des in vitro Vorläufers nicht untersucht worden ist, gibt es auch hier Hinweise für eine unterschiedliche Konformation: (a) während isoliertes OmpA Protein, das frei von LPS ist, von Trypsin völlig abgebaut wird (114), ist der (lösliche?) in vitro Vorläufer gegen Verdauung teilweise geschützt, wobei das Trypsinfragment I mit einem Molekulargewicht von ca. 15 000 entsteht. (b) Mit LPS in vitro assoziiertes OmpA Protein wird durch Trypsin am COOH-Terminus verkürzt, wobei ein Fragment von 24 000 dalton zurückbleibt (114). Würde der in vitro Vorläufer in der gleichen Weise von LPS geschützt, sollte nach Trypsinverdauung ein um 2000 dalton kürzeres Fragment auftauchen, was aber nicht der Fall ist. Man kann also annehmen, daß auch der in vitro Vorläufer in einer anderen Konformation als das OmpA Protein vorliegt.

Der in vitro synthetisierte Vorläufer muß nicht unbedingt löslich sein, denn das System enthält sicher noch geringe Mengen an Membranen, in die sich Vorläufer während der Synthese einlagern könnte. Auf diese Weise wäre er teilweise gegen Trypsin geschützt und das wiederum würde zu dem Trypsinfragment I führen (gibt man Membranen extra dazu, entsteht auch das Trypsinfragment I). Nur wenn das in vitro System völlig frei von Membranen wäre, könnte man behaupten, daß der Vorläufer als lösliches Molekül eine Konformation annimmt, die ihn teilweise vor tryptischer Verdauung schützt. Der Versuch läßt eine diesbezügliche Aussage jedoch nicht zu. Gleichgültig,ob der in vitro Vorläufer löslich ist oder mit Membranstrukturen assoziiert, zeigt er ein von dem OmpA Protein abweichendes Verhalten. OmpA Protein würde in gelöster Form und frei von LPS von Trypsin total abge-

baut, während mit äußerer Membran assoziiertes OmpA Protein ein 24 000 dalton Trypsinfragment ergibt (114). Beides trifft hier aber nicht zu, so daß der Vorläufer in jedem Fall in einer anderen Konformation vorzuliegen scheint.
Was die Proteine der äußeren Membran veranlaßt, sich spezifisch in diese einzulagern und nicht etwa in die Cytoplasmamembran oder das Periplasma, ist ungeklärt. Es bestehen allerdings spezifische Wechselwirkungen zwischen äußeren Membranproteinen und anderen Komponenten der äußeren Membran, wie LPS, Murein oder Lipoprotein (59), die als Auslöser für die Einlagerung dienen könnten. Da der Vorläufer und auch gerade entstandenes OmpA Protein noch in der inneren Membran vorzuliegen scheinen und das in einer von dem fertig eingelagerten Protein abweichenden Konformation, drängt sich folgende Vorstellung auf: nach der Signalabspaltung in der inneren Membran führt die Wechselwirkung mit Komponenten der äußeren Membran zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zur endgültigen und irreversiblen Einlagerung in die äußere Membran.

Die Satellitenproteine des OmpA Gens

Sowohl in normalen Zellen als auch in Minizellen kann, wie bereits erwähnt, das OmpA Protein (ca. 33 000 dalton) und sein Vorläufer (ca. 35 000 dalton) gefunden werden. Daneben treten zwei Proteine mit Molekulargewichten von ca. 27 000 und 25 000 auf (27K- bzw. 25K-Protein), die ich Satellitenproteine genannt habe. Sie stellen ebenfalls Produkte des OmpA Gens dar. Diese Behauptung stützt sich auf folgende Beobachtungen: (a) sowohl in normalen Zellen als auch in Minizellen lassen sich die Satellitenproteine mit OmpA-spezifischem Antiserum ausfällen, (b) eine Mutation im OmpA Gen (Plasmidmutante pTU 105) läßt Vorläufer und OmpA Protein elektrophoretisch etwas langsamer laufen; im gleichen Maße trifft dies auch für die Satellitenproteine zu.
Wie schon der Molekulargewichtsunterschied von etwa 2000 dalton vermuten läßt, handelt es sich bei dem 27K-Protein um den Vorläufer des 25K-Proteins, denn es zeigt denselben Unterschied in der Hitzemodifizierbarkeit zu dem 25K-Protein

wie das pro-OmpA Protein zu dem reifen OmpA Protein und es läßt sich mit einem "pulse-chase" bei 25°C offensichtlich in das 25K-Protein überführen. Da der Unterschied in der Hitzemodifizierbarkeit im Fall des pro-OmpA Proteins auf die zusätzliche Signalsequenz zurückzuführen ist und die Satellitenproteine ebenfalls Produkte des OmpA Gens darstellen, müssen sie am COOH-Terminus verkürzt sein. Die Markierung mit ^{35}S-Cystein zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist. Anhand des Unterschiedes im Molekulargewicht von ca. 8000 dalton zwischen OmpA (pro-OmpA) Protein und dem 25K-(27K-) Protein in SDS-Polyacrylamidgelen läßt sich berechnen, daß 70-75 Aminosäuren COOH-terminal fehlen. Bei 325 (346) Aminosäuren für das OmpA (pro-OmpA) Protein entspricht dies etwa 20% des ungespaltenen Proteins.
Die Satellitenproteine stellen keine Intermediärprodukte während der Synthese des OmpA Proteins dar, wie sie von RANDALL et al. (102) für das Maltose-Bindeprotein gefunden wurden, denn das 25K-Protein ist in einem "pulse-chase" bei 25°C auch noch nach 5 Min. "chase" vorhanden.
Wie läßt sich die Existenz der am COOH-Terminus verkürzten pro-OmpA und OmpA Proteine erklären? Zwei Möglichkeiten sind denkbar: (a) ein Teil der Proteinketten löst sich während der Synthese vorzeitig von den Ribosomen ab, die Signalsequenz wird dann aber wie bei dem vollständigen Vorläufer abgespalten oder (b) das OmpA Protein wird normal als Vorläufer synthetisiert, dieser Vorläufer wird dann teilweise COOH-terminal verkürzt und gleichzeitig oder erst im Anschluß daran erfolgt die Abspaltung des Signalpeptides. In diesem Zusammenhang sollte bemerkt werden, daß bei der in vitro Synthese des pro-OmpA Proteins keine Satellitenproteine auftreten. Dieser Befund spricht für die zweite Möglichkeit. Die Tatsache, daß distinkte Satellitenbanden auftreten, macht eine unspezifische Proteasewirkung am COOH-Terminus eher unwahrscheinlich. Versuche zur Lokalisation von Satelliten-Vorläufer und dem reifen 25K-Protein in der Zellhülle sind nötig, um festzustellen, wo die spezifische Proteolyse des COOH-Terminus stattfindet. Die vorliegenden Versuche mit dem in vivo Vorläufer des OmpA Pro-

teins lassen vermuten, daß sie ebenfalls in der inneren Membran erfolgt, obwohl die gleichen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Sucrosegradienten-Trennung auftreten werden. Für die innere Membran oder das Periplasma als Ort der Proteolyse spricht ebenfalls die Tatsache, daß neu synthetisiertes reifes Satellitenprotein genau wie das frische OmpA Protein in den ersten 20 Sek. noch keine Hitzemodifizierbarkeit zeigt, also wahrscheinlich noch nicht ordnungsgemäß in die äußere Membran eingelagert worden ist. Da das reife Satellitenprotein in normalen Zellen auch bei 37°C in so großen Mengen vorliegt, daß es sich anfärben läßt, ist stark zu vermuten, daß die Satellitenproteine eine, wenn auch bis jetzt unbekannte physiologische Rolle spielen.

Obwohl sich in den letzten Jahren konkrete Modellvorstellungen zur Sekretion prokaryontischer Proteine entwickelt haben, so ist die Frage, wie z.B. die Proteine der äußeren Membran von E. coli dorthin gelangen, noch weitgehend unbeantwortet. Trotz der Erkenntnis, daß auch das OmpA Protein mit einer zusätzlichen, charakteristischen Signalsequenz synthetisiert wird, ist noch nicht entschieden,welches der gängigen Modelle die Situation korrekt wiedergibt. Die Möglichkeit, bei dem OmpA Protein auch in vivo den Vorläufer sichtbar zu machen, bietet einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt, die Biogenese dieses Proteins detaillierter zu erforschen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu den Konformationen von Vorläufer und reifem Protein haben bereits etwas Licht in das Dunkel gebracht.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Vorläufer des OmpA Proteins wurde in Minizellen, die ein Plasmid mit dem klonierten OmpA Gen enthalten, identifiziert. Nach seiner Isolierung wurde die aufgrund der DNA-Sequenz des OmpA Gens vorhersagbare Primärstruktur des Signalpeptides durch eine Teilsequenzierung bestätigt. Nicht nur in Minizellen, auch in normalen Zellen von E. coli konnte der Vorläufer mit "pulse-chase" Versuchen nachgewiesen werden. In Sucrosegradienten sedimentierte dieser Vorläufer mit der inneren Membran. Gleichzeitig fand sich hier auch reifes OmpA Protein, so daß die Abspaltung der Signalsequenz in der inneren Membran stattzufinden scheint. Der Vorläufer besitzt sowohl in Minizellen als auch in normalen Zellen eine andere Konformation als das fertig eingelagerte OmpA Protein,denn er zeigte nicht die dem OmpA Protein eigene Hitzemodifizierbarkeit, sondern lief elektrophoretisch immer mit demselben Molekulargewicht unabhängig von der Lösungstemperatur. Dasselbe Verhalten konnte bei OmpA Protein aus normalen Zellen beobachtet werden, das nicht älter als 20 Sekunden ist, so daß wohl erst die im Laufe der Einlagerung in die äußere Membran erfolgende Wechselwirkung mit dieser die Konformationsänderung herbeiführt. In einem zellfreien Transkriptions-Translations-System wurde die Synthese des OmpA Proteins untersucht und gefunden, daß nur sein Vorläufer synthetisiert wird. Es fanden sich Hinweise, daß auch dieser in vitro Vorläufer eine von dem fertigen OmpA Protein abweichende Konformation besitzt. Zugabe von Membranen unter verschiedenen Bedingungen führte nicht zu einer Abspaltung der Signalsequenz in vitro. Zwei weitere Proteine mit Molekulargewichten von etwa 27 000 und 25 000, Satellitenproteine genannt, konnten ebenfalls als Produkte des OmpA Gens identifiziert werden. Sie wurden sowohl in Minizellen als auch in normalen Zellen in größeren Mengen nachgewiesen. Ferner konnte gezeigt werden, das es sich um Vorläufer bzw. OmpA Protein handelt, die beide am COOH-Terminus um ca. 70 Aminosäuren verkürzt sind. Ihre physiologische Funktion bleibt zu erforschen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Achtman, M., Kennedy, N., Skurray, R.

Cell-cell interactions in conjugating E. coli: role of traT protein in surface exclusion.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5104-5108

2. Achtman, M., Manning, P., Edelbluth, C., Herrlich, P.

Export without proteolytic processing of inner and outer membrane proteins encoded by F sex factor tra cistrons in E. coli minicells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4837-4841

3. Achtman, M., Willets, N., Clark, A.

Beginning a genetic analysis of conjugational transfer determined by the F factor in E. coli by isolation and characterization of transfer-deficient mutants.
J. Bact. 106 (1971) 529-538

4. Allington, W., Cordry, A., McCullough, G., Mitchell, D., Nelson, J.

Electrophoretic concentration of macromolecules.
Anal. Biochem. 85 (1978) 188-196

5. van Alphen, L., Havekes, L., Lugtenberg, B.

Major outer membrane protein d of E. coli K-12. Purification and in vitro activity on bacteriophage K3 and F-pilus mediated conjugation.
FEBS Lett. 75 (1977) 285-290

6. Ames, G.

Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis: membrane, soluble, and periplasmic fractions.
J. Biol. Chem. 249 (1974) 634-644

7. Ames, G., Spudich, E., Nikaido, H.

Protein composition of the outer membrane of Salmonella thyphimurium: effect of lipopolysaccharide mutants.
J. Bact. 117 (1974) 406-416

8. Archibald, A., Baddiley, J., Blumson, N.

The teichoic acids.
Adv. Enzymol. 30 (1967) 223-253

9. Bachmann, B., Low, K., Taylor, A.

Recalibrated linkage map of E. coli K-12.
Bacteriol. Rev. 40 (1976) 116-167

10. Bassford, P., Beckwith, J.

E. coli mutants accumulating the precursor of a secreted protein in the cytoplasm.
Nature 277 (1979) 538-541

11. Bassford, P., Silhavy, T., Beckwith, J.

Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into E. coli periplasm.
J. Bact. 139 (1979) 19-31

12. Bayer, M.

Role of adhesion zones in bacterial cell-surface function and biogenesis.
in *Membrane biogenesis* (ed. A. Tzagoloff)
Plenum Press, New York (1975) 393 ff.

13. Bayer, M., Thurow, H.

Polysaccharide capsule of E. coli: microscope study of its size, structure, and sites of synthesis.
J. Bact. 130 (1977) 911-936

14. Beck, E., Bremer, E.

Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II* of E. coli K-12.

Appendix: Gamon, K., Schmidmayr, W., Henning, U.
Protein-chemical evidence for the signal sequence of the pro-OmpA protein.
Nucleic Acids Res. 8 (1980) 3011-3027

15. Bedouelle, H., Bassford, P., Fowler, A., Zabin, J., Beckwith, J., Hofnung, M.

Mutations which alter the function of the signal sequence of the maltose-binding protein of E. coli.
Nature 285 (1980) 78-81

16. Blobel, G., Dobberstein, B.

Transfer of proteins across membranes: presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of mureine myeloma.
J. Cell. Biol. 67 (1975) 835-851

17. Blobel, G., Dobberstein, B.

Transfer of proteins across membranes: reconstruction of functional rough microsomes from heterologous components.
J. Cell. Biol. 67 (1975) 852-862

18. Bragg, P., Hou, C.

Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 274 (1972) 478-488

19. Braun, V.

Covalent lipoprotein from the outer membrane of E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 335-377

20. Braun, V., Hantke, K.

Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems.
in *Microbial interactions* (ed. J.L. Reissig)
Chapman and Hall, London (1977) 99-137

21. Braun, V., Rehn, K.

Chemical characterization, spatial distribution, and function of a lipoprotein (mureinlipoprotein) of the E. coli cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure.
Eur. J. Biochem. 10 (1969) 426-438

22. Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag, I., Henning, U.

Cloned structural gene (ompA) for an integral outer membrane protein of E. coli K-12. Localization on hybrid plasmid pTU 100 and expression of a fragment of the gene.
Molec. Gen. Genet. 179 (1980) 13-20

23. Cancedda, R., Schlessinger, M.

Localization of polyribosomes containing alkaline phosphatase nascent polypeptides on membranes of E. coli.
J. Bact. 117 (1974) 290-301

24. Casadaban, M.

Fusion of the E. coli lacZ gene to the ara promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 809-813

25. Chai, T., Foulds, J.

Demonstration of a missing outer membrane protein in tolG mutants of E. coli.
J. Mol. Biol. 85 (1974) 465-474

26. Chang, C., Blobel, G., Model, P.

Detection of prokaryotic signal peptidase in an E. coli membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent f1 pre-coat protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 361-365

27. Chang, C., Inouye, H., Model, P., Beckwith, J.

Processing of alkaline phosphatase precursor to the mature enzyme by an E. coli inner membrane preparation.
J. Bact. 142 (1980) 726-728

28. Chen, R., Schmidmayr, W., Krämer, C., Chen-Schmeisser, U., Henning, U.

Primary structure of major outer membrane protein II* (OmpA protein) of E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4592-4596

29. Chopra, I., Shales, S.

Comparison of the polypeptide composition of E. coli outer membranes prepared by two methods.
J. Bact. 144 (1980) 425-427

30. Cleveland, D., Fischer, S., Kirschner, M., Lämmli, U.

Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 252 (1977) 1102-1106

31. Crowlesmith, I., Gamon, K., Henning, U.

Precursor proteins are in vivo intermediates in the synthesis of two major outer membrane proteins, the OmpA and OmpF proteins, of E. coli K-12.
Eur. J. Biochem. (1980) im Druck

32. Datta, D., Arden, B., Henning, U.

Major proteins of the E. coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors.
J. Bact. 131 (1977) 821-829

33. Datta, D., Krämer, C., Henning, U.

Diploidy for a structural gene specifying a major protein of the outer cell envelope membrane from E. coli.
J. Bact. 128 (1976) 834-841

34. Decad, G., Nakae, T., Nikaido, H.

Permeability of E. coli and Salmonella typhimurium cell wall to oligosaccharides.
Fed. Proc. 33 (1974) 1240

35. Decad, G., Nikaido, H.
Outer membrane of gram-negative bacteria XII: molecular sieving function of cell wall.
J. Bact. 128 (1976) 325-336

36. Edman, P.

in *Protein sequence determination* (ed. S. Needleman)
Springer-Verlag, Heidelberg (1970) 211-255

37. Emr, S., Hedgpeth, J., Clement, J., Silhavy, T., Hofnung, M.

Sequence analysis of mutations that prevent export of lambda receptor, an E. coli outer membrane protein.
Nature 285 (1980) 82-85

38. Emr, S., Schwartz, M., Silhavy, T.

Mutations altering the cellular localization of the phage lambda receptor, an E. coli outer membrane protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 5802-5806

39. Emr, S., Silhavy, T.

Mutations affecting localization of an E. coli outer membrane protein, the bacteriophage lambda receptor.
J. Mol. Biol. 141 (1980) 63-90

40. Endermann, R., Krämer, C., Henning, U.

Major outer membrane proteins of E. coli K-12: evidence for protein II* being a transmembrane protein.
FEBS Lett. 86 (1978) 21-24

41. Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J., Earhart, C.

Solubilization of the cytoplasmic membrane of E. coli by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate.
J. Bact. 115 (1973) 717-722

42. Foulds, J.

tolF locus in E. coli: chromosomal location and relationship to loci cmlB and tolD.
J. Bact. 128 (1976) 604-608

43. Garten, W., Henning, U.

Synthesis in minicells of the major proteins of the E. coli outer cell envelope membrane.
FEBS Lett. 67 (1976) 303-305

44. Gayda, R., Henderson, G., Markovitz, A.

Neuroactive drugs inhibit trypsin and outer membrane processing in E. coli K-12.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 2138-2142

45. Gayda, R., Markovitz, A.

Cloned DNA fragment specifying major outer membrane protein a in E. coli K-12.
J. Bact. 136 (1978) 369-380

46. Ghuysen, J., Shockman, G.

Biosynthesis of peptidoglycan.
in *Bacterial membranes and walls* (ed. L. Leive)
Marcel Dekker, New York (1973) 37-130

47. Halegoua, S., Inouye, M.

Translocation and assembly of outer membrane proteins of E. coli. Selective accumulation of precursors and novel assembly intermediates caused by phenethyl alcohol.
J. Mol. Biol. 130 (1979) 39-61

48. Halegoua, S., Sekizawa, J., Inouye, M.

A new form of structural lipoprotein of outer membrane of E. coli.
J. Biol. Chem. 252 (1977) 2324-2330

49. Hantke, K.

Phage T6-colicin K receptor and nucleoside transport in E. coli.
FEBS Lett. 70 (1976) 109-112

50. Hedgpeth, J., Clement, J., Marchal, C., Perrin, D., Hofnung, M.

DNA sequence encoding the NH_2-terminal peptide involved in transport of lambda receptor, an E. coli secretory protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2621-2625

51. Henning, U.

Determination of cell shape in bacteria.
Ann. Rev. Biochem. 43 (1975) 45-60

52. Henning, U., Haller, I.

Mutants of E. coli K-12 lacking all major proteins of the outer cell envelope membrane.
FEBS Lett. 55 (1975) 161-164

53. Henning, U., Höhn, B., Sonntag, I.

Cell envelope and shape of E. coli K-12: the ghost membrane.
Eur. J. Biochem. 39 (1973) 27-36

54. Henning, U., Royer, H., Teather, R., Hindennach, I., Hollenberg, C.

Cloning of the structural gene (ompA) for an integral outer membrane protein of E. coli K-12.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4360-4364

55. Henning, U., Schmidmayr, W., Hindennach, I.

Major proteins of the outer cell envelope membrane of E. coli K-12: multiple species of protein I.
Molec. Gen. Genet. 154 (1977) 293-298

56. Henning, U., Schwarz, H., Chen, R.

Radioimmunological screening method for specific membrane proteins.
Anal. Biochem. 97 (1979) 153-157

57. Heppel, L.
The concept of periplasmic enzymes.
in *Structure and function of biological membranes*
(ed. L. Rothfield)
Academic Press, New York (1971) 224-247

58. Inouye, H., Beckwith, J.

Synthesis and processing of an E. coli alkaline phosphatase precursor in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 1440-1444

59. Inouye, M., Halegoua, S.

Secretion and membrane localization of proteins in E. coli.
CRC Crit. Rev. Biochem. 7 (1980) 339-371

60. Inouye, M., Shaw, J., Shen, C.

The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of E. coli.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 8154-8159

61. Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S., Inouye, M.

Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the E. coli outer membrane.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 1004-1008

62. Ito, K.

Effects of a protease inhibitor on biosynthesis of E. coli proteins.
J. Bact. 132 (1977) 1021-1023

63. Ito, K., Mandel, G., Wickner, W.

Soluble precursor of an integral membrane protein: synthesis of procoat protein in E. coli infected with bacteriophage M13.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1199-1203

64. Ito, K., Sato, T., Yura, T.

Synthesis and assembly of the membrane proteins in E. coli.
Cell 11 (1977) 551-559

65. Janoff, A., Hang, A., McGroarty, E.

Anesthetics alter outer membrane architecture and temperature range of growth of E. coli K-12.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 95 (1980) 1364-1371

66. Kanazawa, H., Wu, H.

Lipoprotein synthesis in E. coli spheroplasts: accumulation of lipoprotein in cytoplasmic membrane.
J. Bact. 137 (1979) 818-823

67. Kessler, S.

Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immun. 115 (1975) 1617-1624

68. Koshland, D., Botstein, D.

Secretion of ß-lactamase requires the carboxy end of the protein.
Cell 20 (1980) 749-760

69. Lee, N., Inouye, M.

Outer membrane proteins of E. coli: biosynthesis and assembly.
FEBS Lett. 39 (1974) 167-170

70. de Leij, L., Kingma, J., Witholt, B.

Insertion of newly synthesized proteins into the outer membrane of E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 512 (1978) 365-376

71. de Leij, L., Kingma, J., Witholt, B.

Nature of the regions involved in the insertion of newly synthesized protein into the outer membrane of E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 553 (1979) 224-234

72. Levy, S.

Very stable prokaryotic messenger RNA in chromosomeless E. coli minicells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2900-2904

73. Lin, J., Giam, C., Wu, H.

Assembly of outer membrane lipoprotein in E. coli.
J. Biol. Chem. 255 (1980) 807-811

74. Lin, J., Wu, H.

Assembly of membrane proteins in E. coli.
J. Biol. Chem. 255 (1980) 802-806

75. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alphen, L.

Electrophoretic resolution of the major outer membrane proteins of E. coli K-12 into four bands.
FEBS Lett. 58 (1975) 254-258

76. Mac Gregor, C., Bishop, C., Blech, J.

Localization of proteolytic activity in the outer membrane of E. coli.
J. Bact. 137 (1979) 574-583

77. Mandel, G., Wickner, W.

Translational and post-translational cleavage of M13 procoat protein: extracts of both the cytoplasmic and outer membranes of E. coli contain leader peptidase activity.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 236-240

78. Manning, P., Puspurs, A., Reeves, P.

Outer membrane of E. coli K-12: isolation of mutants with altered protein 3A by using host range mutants of bacteriophage K3.
J. Bact. 127 (1976) 1080-1084

79. Marchal, C., Perrin, D., Hedgpeth, J., Hofnung, M.

Synthesis and maturation of lambda receptor in E. coli K-12: in vivo and in vitro expression of gene lamB under lac promotor control.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 1491-1495

80. Metcalfe, M., Holland, I.

Synthesis of a major outer membrane porin by E. coli spheroplasts.
FEMS Microbiol. Lett. 7 (1980) 111-114

81. Milstein, C., Brownlee, G., Harrison, T., Mathews, M.

A possible precursor of immunoglobulin light chains.
Nature New Biol. 239 (1972) 117-120

82. Moreno, F., Fowler, A., Hall, M., Silhavy, T., Zabin, I., Schwartz, M.

A signal sequence is not sufficient to lead ß-galactosidase out of the cytoplasm.
Nature 286 (1980) 356-359

83. Movva, N., Nakamura, K., Inouye, M.

Amino acid sequence of the signal peptide of OmpA protein, a major outer membrane protein of E. coli.
J. Biol. Chem. 255 (1980) 27-29

84. Mühlradt, P., Golecki, J.

Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of Salmonella typhimurium.
Eur. J. Biochem. 51 (1975) 343-352

85. Mühlradt, P., Menzel, J., Golecki, J., Speth, V.

Lateral mobility and surface density of lipopolysaccharide in the outer membrane of Salmonella typhimurium.
Eur. J. Biochem. 43 (1974) 533-539

86. Mühlradt, P., Menzel, J., Golecki, J., Speth, V.

Outer membrane of Salmonella: sites of export of newly synthesized lipopolysaccharide on the bacterial surface.
Eur. J. Biochem. 35 (1973) 471-481

87. Nakae, T.

Identification of the outer membrane protein of E. coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 71 (1976) 877-884

88. Nakae, T., Nikaido, H.

Outer membrane as a diffusion barrier in Salmonella typhimurium.
J. Biol. Chem. 250 (1975) 7359-7365

89. Neu, H., Chou, J.

Release of surface enzymes in enterobacteriaceae by osmotic shock.
J. Bact. 94 (1967) 1934-1945

90. Nikaido, H.

Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide and the outer membrane layer of gram-negative cell wall.
in *Bacterial membranes and walls* (ed. L. Leive)
Marcel Dekker, New York (1973) 132-208

91. Nikaido, H.

Outer membrane of Salmonella typhimurium. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances.
Biochim. Biophys. Acta 433 (1976) 118-132

92. Nikaido, H., Nakae, T.

The outer membrane of gram-negative bacteria.
Advanc. Microbial Physiol. 20 (1979) 163-250

93. Osborn, M., Gander, J., Parisi, E., Carson, J.

Mechanism and assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 3962-3972

94. Osborn, M., Wu, H.

Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 34 (1980) 369-422

95. Oxender, D.
Membrane transport.
Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 777-814

96. Oxender, D., Anderson, J., Daniels, C., Landick, R., Gunsalus, R., Zurawski, G., Yanofsky, C.

Amino-terminal sequence and processing of the precursor of the leucine-specific binding protein, and evidence for conformational differences between the precursor and the mature form.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2005-2009

97. de Pamphilis, M., Adler, J.

Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer liopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane.
J. Bact. 105 (1971) 396-407

98. de Petris, S.

Ultrastructure of the cell wall of E. coli and chemical nature of its constituent layers.
J. Ultrastruct. Res. 19 (1967) 45-83

99. Pugsley, A., Lee, D., Schnaitman, C.

Genes affecting the major outer membrane proteins of E. coli K-12: mutations at nmpA and nmpB.
Molec. Gen. Genet. 177 (1980) 681-690

100. Randall, L., Hardy, S.

Synthesis of exported proteins by membrane-bound polysomes from E. coli.
Eur. J. Biochem. 75 (1977) 43-53

101. Randall, L., Hardy, S., Josefsson, L.

Precursors of three exported proteins in E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1209-1212

102. Randall, L., Josefsson, L., Hardy, S.

Novel intermediates in the synthesis of maltose-binding protein in E. coli.
Eur. J. Biochem. 107 (1980) 375-379

103. Randall-Hazelbauer, L., Schwartz, M.

Isolation of the bacteriophage lambda receptor from E. coli.
J. Bact. 116 (1973) 1436-1446

104. Regnier, P., Thang, M.

Masked proteolytic activity localized in the outer membrane of E. coli.
FEBS Lett. 102 (1979) 291-296

105. di Rienzo, J., Inouye, M.

Lipid fluidity-dependent biosynthesis and assembly of the outer membrane proteins of E. coli.
Cell 17 (1979) 155-161

106. di Rienzo, J., Nakamura, K., Inouye, M.

The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions.
Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 481-532

107. Rosenbusch, J.

Characterization of the major envelope protein from E. coli. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulphate binding.
J. Biol. Chem. 249 (1974) 8019-8029

108. Sarthy, A., Fowler, A., Zabin, I., Beckwith, J.

Use of gene fusions to determine a partial signal sequence of alkaline phosphatase.
J. Bact. 139 (1979) 932-939

109. Schaller, H., Beck, E., Takanami, M.

Sequence and regulatory signals of the filamentous phage genome.
in *The single stranded DNA phages* (ed. D. Dehnhardt, D. Dressler, D. Ray)
Cold Spring Harbour Laboratory, New York (1978) 139-153

110. Schmitges, C., Henning, U.

The major proteins of the E. coli outer cell envelope membrane.
Eur. J. Biochem. 63 (1976) 47-52

111. Schnaitman, C.

Solubilization of the cytoplasmic membrane of E. coli by Triton X-100.
J. Bact. 108 (1971) 545-552

112. Schnaitman, C.

Outer membrane proteins of E. coli IV: differences in outer membrane proteins due to strain and cultural differences.
J. Bact. 118 (1974) 454-464

113. Schweizer, M., Henning, U.

Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of E. coli K-12.
J. Bact. 129 (1977) 1651-1652

114. Schweizer, M., Hindennach, I., Garten, W., Henning, U.

Major proteins of the E. coli outer cell envelope membrane. Interaction of protein II* with lipopolysaccharide.
Eur. J. Biochem. 82 (1978) 211-217

115. Sekizawa, J., Inouye, S., Halegoua, S., Inouye, M.

Precursors of major outer membrane proteins of E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77 (1977) 1126-1133

116. Silhavy, T., Shuman, H., Beckwith, J., Schwartz, M.

Use of gene fusion to study outer membrane protein localization in E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5411-5415

117. Skurray, R., Hancock, R., Reeves, P.

Con$^-$ mutants: class of mutants in E. coli K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage.
J. Bact. 119 (1974) 726-735

118. Smit, J., Nikaido, H.

Outer membrane of gram-negative bacteria XVIII. Electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of Salmonella typhimurium.
J. Bact. 135 (1978) 687-702

119. Smit, J., Kamio, Y., Nikaido, H.

Outer membrane of Salmonella typhimurium: chemical analysis and freeze fracture studies with lipopolysaccharide mutants.
J. Bact. 124 (1975) 942-958

120. Smith, W., Tai, P., Davis, B.

Nascent peptide as sole attachment of polysomes to membranes in bacteria.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 814-817

121. Smith, W., Tai, P., Thompson, R., Davis, B.

Extracellular labelling of nascent polypeptides traversing the membrane of E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 2830-2834

122. Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y., Henning, U.

Cell envelope and shape of E. coli: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins.
J. Bact. 136 (1978) 280-285

123. Studier, F.

Analysis of bacteriophage T7 early RNA's and proteins on slab gel.
J. Molec. Biol. 79 (1973) 237-248

124. Sugimoto, K., Sugisaki, H., Okamoto, T., Takanami, M.

Studies on bacteriophage fd DNA. IV The sequence of mRNA for the major coat protein gene.
J. Molec. Biol. 111 (1977) 487-507

125. Sutcliffe, J.

Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of E. coli plasmid pBR 322.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3737-3741

126. Szmelcman, S., Hofnung, M.

Maltose transport in E. coli K-12: involvement of the bacteriophage lambda receptor.
J. Bact. 124 (1975) 112-118

127. Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T., Boos, W.

Maltose transport in E. coli K-12: a comparison of transport kinetics in wild type and lambda-resistant mutants with the dissociation constants of the maltose-binding protein as measured by fluorescence quenching.
Eur. J. Biochem. 65 (1976) 13-19

128. Varenne, S., Piovant, M., Pages, J., Lazdunski, C.

Evidence for synthesis of alkaline phosphatase on membrane-bound polysomes in E. coli.
Eur. J. Biochem. 86 (1978) 603-606

129. Weidel, W., Pelzer, H.

Bagshaped macromolecules: a new outlook on bacterial cell wall.
Advan. Enzymol. 26 (1964) 193-232

130. Wickner, W.

Assembly of proteins into membranes.
Science 210 (1980) 861-868

131. Wickner, W.

The assembly of proteins into biological membranes: the membrane trigger hypothesis.
Ann. Rev. Biochem. 48 (1979) 23-45

132. Wilson, V., Hogg, R.

The NH_2-terminal sequence of a precursor form of the arabinose-binding protein.
J. Biol. Chem. 255 (1980) 6745-6750

133. Witholt, B., van Heerikhuizen, H., de Leij, L.

How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane?
Biochim. Biophys. Acta 443 (1976) 534-544

134. Yu, F., Mizushima, S.

Stimulation by lipopolysaccharide of the binding of outer membrane proteins O-8 and O-9 to the peptidoglycan layer of E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 74 (1977) 1397-1402

Lebenslauf

13.1.53	geboren in Frankfurt/Main
1959-1962	1.-3. Volksschulklasse in Fulda an der "Schule am Gallasiniring"
1962-1963	4. Volksschulklasse in Frankfurt/Main an der Westendschule
1963-1971	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Frankfurt/Main
April-Juni 1969	dreimonatiger Aufenthalt in England auf dem Lancing College/Surrey
1969	Wahl des neusprachlichen Zweiges
Juni 1971	Abitur am Goethe-Gymnasium
Juli 1971	Freistellung vom Wehrdienst wegen beschränkter Tauglichkeit
WS 71/72	Immatrikulation in Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main
21.3.1974	Vordiplom in Biologie
SS 1974	Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studienfach: Biochemie
WS 74/75	Wechsel auf das Studienfach Biologie
Nov.1977-Nov.1978	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie Tübingen
28.11.78	Diplom-Hauptprüfung in Biologie, Hauptfach Mikrobiologie
ab Dez.1978	Anfertigung der vorliegenden Dissertationsarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Henning

Meine wichtigsten akademischen Lehrer waren:

K.-H. Altendorf, F.W. Bentrup, V. Braun, H. Dahmen,
K. Fiedler, H. Frank, D. Gradmann, J. Guglielmi, K. Hantke,
U. Henning, J. Höltje, W. Loeffler, W. Lötschert,
W. Martienssen, G.F. Meyer, G. Mickoleit, G. Neuweiler,
P. Overath, M. Rosenmund, W. Schlote, H.U. Seitz,
U. Weser, Chr. Winter, H. Zähner.